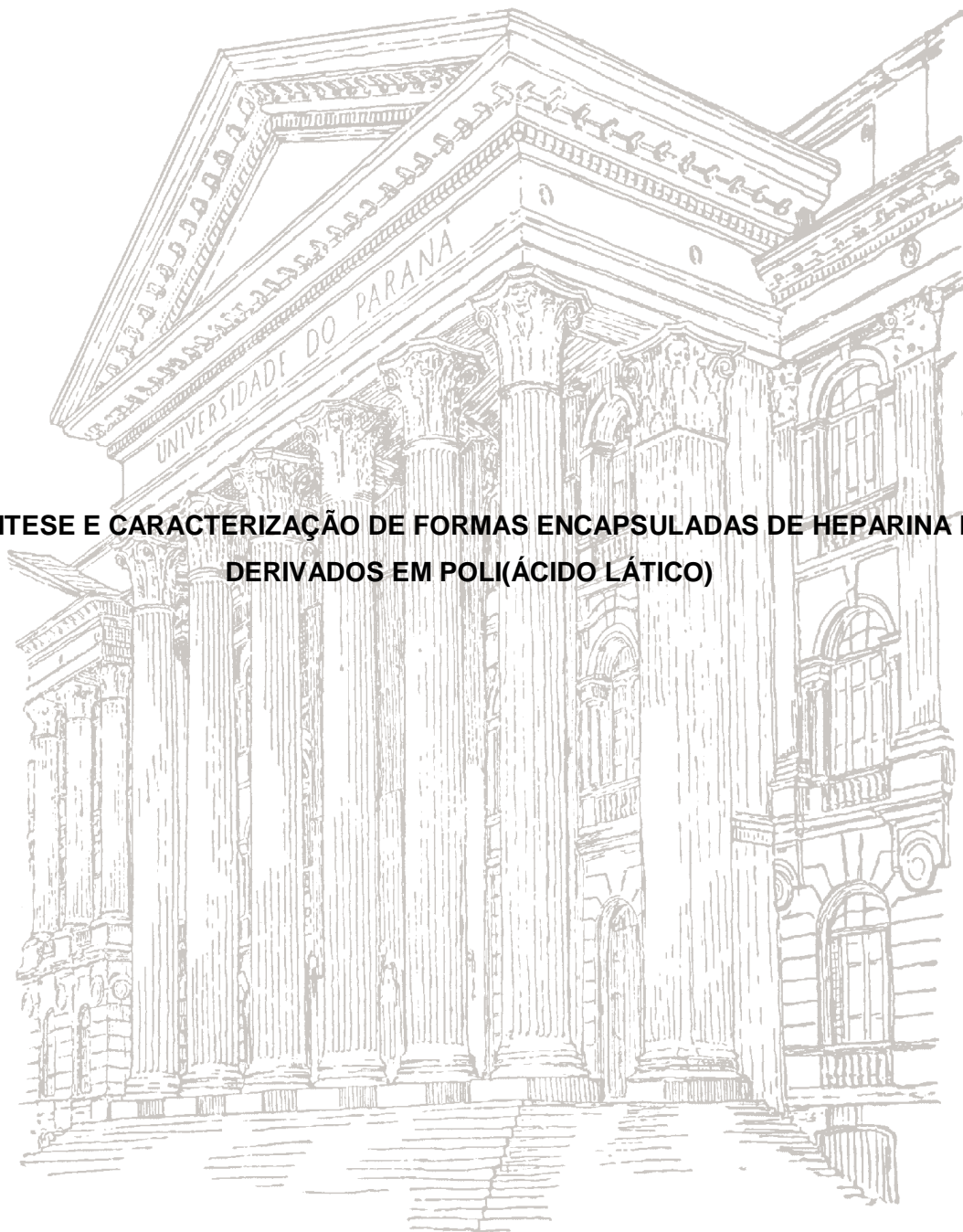


**CARLOS EDUARDO LUNELLI**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS ENCAPSULADAS DE HEPARINA E  
DERIVADOS EM POLI(ÁCIDO LÁTICO)**



**UFPR  
2013**

**CARLOS EDUARDO LUNELLI**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS ENCAPSULADAS DE HEPARINA E  
DERIVADOS EM POLI(ÁCIDO LÁTICO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profª Drª Sônia Faria Zawadzki

Coorientadora: Profª Drª Josiane Padilha de Paula

**Curitiba  
2013**

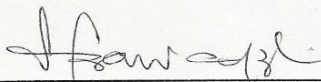
**TERMO DE APROVAÇÃO****SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS ENCAPSULADAS DE HEPARINA E  
DERIVADOS EM POLI(ÁCIDO LÁTICO)**

por

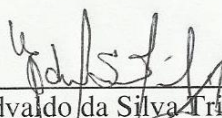
**CARLOS EDUARDO LUNELLI**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

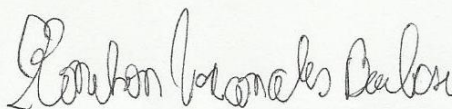
Orientador:



Prof.ª Dr.ª Sônia Faria Zawadzki  
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Dep. de Biol. Celular – UFPR



Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de abril de 2013

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe Elfi Tereza Lunelli (*in memorian*), meu porto seguro e refúgio de todas as horas, a qual continua, onde estiver a cuidar de mim e a acreditar que eu posso ir muito mais além. Ao anjo em forma humana, meu irmão Marco Antonio Lunelli (*in memorian*) que Deus enviou para me ensinar que a vida é válida, que sempre devo lutar até o fim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter sido meu pilar de sustentação para conseguir enfrentar as inúmeras perdas que tive ao longo de meu caminho.

Agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja através das análises realizadas, com auxílio científico ou muitas vezes ensinando uma nova maneira de pensar.

Agradeço, em especial, à Profª Drª Sônia Faria Zawadzki pela orientação, amizade, paciência e ensinamentos durante os dois anos de mestrado.

Agradeço à Profª Drª Josiane Padilha de Paula pela coorientação deste mestrado.

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e ao Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa por aceitarem participar da banca examinadora.

Aos professores: Prof. Dr. Valdir Soldi, Prof. Dr. Roberto Pontarolo, à Profa. Drª Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia e ao Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro por aceitarem o convite para membros suplentes da banca examinadora.

Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos Laboratórios de RMN, Infravermelho, CEPESQ e Labpol do Departamento de Química e à Universidade Federal do Paraná pela realização de análises para caracterização de materiais.

Ao Laboratório de microscopia eletrônica da UFPR.

Ao LAMIR por realizar as análises de termogravimetria e granulometria à laser.

Ao Laboratório de Ciências Farmacêuticas da UEPG, sob responsabilidade da Profª Drª Josiane Padilha de Paula, pela análise de citotoxicidade em hemácias.

Ao Hospital de Clínica da UFPR por viabilizar a compra do fármaco Heparina.

Aos amigos e colegas do Labpol: Thiago, Tiago, Simone, Breidi, Mara, Marcel, Gustavo, Danilo, Francielly, Gabriela pelos momentos de descontração no laboratório ou em todos os outros momentos.

Ao amigo Juliano Bertozzi da Silva, que mesmo estando cursando seu mestrado no Canadá, realizou análises de anterioridade de propriedades intelectuais nas bases, americana e européia, para a redação da patente do presente trabalho.

Ao Msc. Alan Diego da Conceição Santos por ter realizado as análises de RMN.

Àquelas que representam a amizade verdadeira e indissolúvel: Ivete da Silva Costa, Maria Paula Crastechini, Ilza Rosina de Castro e Maria Arlete Massuquetto.

À minha família, especialmente minha mãe Elfi Tereza Lunelli (*in memorian*), meu irmão Marco Antonio Lunelli (*in memorian*) e meu padrasto Teodoro Schier por acreditarem em meu potencial e incentivarem sempre minhas escolhas.

Aos meus tios, tias, primos, primas e à família Lunelli que estiveram ao meu lado em todos os momentos de dificuldade que enfrentei ao longo desses dois anos.

À Thaisa Mariano Gomes por ingressar em minha vida em um momento tão importante e decisivo.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

## RESUMO

Anticoagulantes são utilizados como terapêutica medicamentosa para prevenir ou tratar distúrbios do sangue tais como os tromboembólicos. A heparina é um anticoagulante que age através da formação de um complexo com a antitrombina. Sua administração ocorre por via parenteral (subcutânea ou endovenosa), devido à sua natureza hidrofílica. Um tratamento via oral utilizando este fármaco consiste em uma atraente alternativa clínica visto o grande desconforto causado pelas injeções diárias. Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis estão entre os excipientes (veículo para o princípio ativo) mais utilizados em tecnologia farmacêutica e, dentre eles, destaca-se o poli(ácido láctico) devido à sua fácil degradação e formação de subprodutos inócuos ao organismo. O presente trabalho reporta o estudo da síntese do poli(ácido láctico) bem como a reação de conjugação entre ácido esteárico e heparina. Assim, foi obtido um novo material como alternativa para encapsulação no polímero poli(ácido láctico). Polímero, conjugado e nanocápsulas foram caracterizados por técnicas convencionais de análise, tais como espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial, análise granulométrica e microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: heparina, conjugado HEP-AE, nanopartículas, anticoagulante, PLA.



## ABSTRACT

Anticoagulants are used in therapeutics to prevent or treat blood disorder such as thromboembolism. Heparin is an anticoagulant that works through the development of a complex with antithrombin. It is parenteral administered (subcutaneous or endovenous), because of its hydrophilic nature. An oral treatment using this medicament is an interesting clinical choice due to the unpleasantness of daily injections. Biocompatible polymers and biodegradable material are among the most used excipients (carrier for the active ingredients of a medication) in pharmacy technology. Among them, polylactic acid distinguishes for being easily degradable and forming innocuous by products. Regarding the exposed principles, the present work reports the study of polylactic acid synthesis, as well as the study of the conjugation reactions of stearic acid with heparin. Hence, a new material was obtained as an alternative to encapsulation in polylactic acid polymer. Polymer, conjugation and nanocapsule were characterized by conventional analysis techniques, such as infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, thermogravimetric analysis, calorimetric exploratory differential, soil gradation analysis and scanning electron microscope.

Keywords: heparin, conjugated system HEP-AE, nanoparticles, anticoagulant, PLA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata da coagulação sanguínea.....	18
Figura 2. Diagrama esquemático da interação da heparina com o sistema antitrombina/trombina com base no processo da anticoagulação .....	12
Figura 3. Representação química da unidade estrutural repetitiva da heparina .....	22
Figura 4. Representação da estrutura química do ácido esteárico.....	23
Figura 5. Representação da estrutura química do poli(ácido láctico) .....	24
Figura 6. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas..	26
Figura 7. Fluxograma da síntese de conjugados de heparina .....	31
Figura 8. Representação esquemática das possíveis estruturas dos materiais derivados de heparina e ácido esteárico.....	32
Figura 9. Material obtido através da polimerização do ácido láctico.....	39
Figura 10. Material obtido através da reação de conjugação AE-heparina.....	39
Figura 11. Aspecto das nanopartículas obtidas.....	40
Figura 12. Espectro de infravermelho comparativo: conjugado, mistura física, heparina e AE.....	44
Figura 13. Espectro de $^1\text{H}$ RMN da heparina utilizando solvente DMSO .....	45
Figura 14. Espectro de $^1\text{H}$ RMN do conjugado HEP/AE utilizando solvente DMSO ....	46
Figura 15. Difratoograma do conjugado AE-heparina comparativamente aos difratogramas da heparina AE e mistura física AE/HEP .....	47
Figura 16. Termogramas obtidos por análise termogravimétrica.....	48
Figura 17. Derivada primeira dos termogramas obtidos por análise termogravimétrica .....	50
Figura 18. Termogramas resultantes da análise calorimétrica (DSC).....	52
Figura 19. Curvas analíticas para os perfis granulométricos .....	53
Figura 20. Aspecto morfológico das partículas produzidas por emulsão simples (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento 5000 X).....	54
Figura 21. Aspecto morfológico das partículas produzidas por emulsão simples (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento 10000 X).....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de caracterização empregadas .....	40
Tabela 2. Massas molares determinados para o poli(ácido láctico) .....	42
Tabela 3. Dados sobre a dispersão granulométrica das partículas .....	54

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AE	Ácido esteárico
AT	Antitrombina
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento profissional de nível superior
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
DCC	Dicicloexil carbodiimida
DCHU	Dicicloexilureia
DMAP	Dimetil aminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EPCR	Células endoteliais receptoras da proteína C
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HEP	Heparina
LAC	Lactídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
$M_n$	Massa molar numérica média
$M_w$	Massa molar ponderal média
m/m	Massa por massa
m/V	Massa por volume
PC	Proteína C
PD	Polidispersão
PLA	Poli(ácido láctico)
PLAC	Polilactídeo
PS	Proteína S
PVAI	Poli(álcool vinílico)
RMN	Ressonância magnética nuclear
TFPI	Inibidor do fator da via tecidual
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UI	Unidades internacionais

## GLOSSÁRIO

**Anticoagulante** – Compostos farmacológicos administrados para evitar a formação de trombos e coágulos.

**Citocinas** - extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes.

**Embolia** – Trombos que bloqueiam vasos sanguíneos.

**Fibrinólise** - é o processo através do qual um coágulo de fibrina (produto da coagulação do sangue) é destruído.

**Hemostasia** – Processo fisiológico de equilíbrio entre o estado hemorrágico e o processo coagulatório.

**Heparanosulfato** - é um polissacarídeo linear encontrada em todos os tecidos dos animais. Ocorre como um proteoglicano em que dois ou três cadeias estão ligados em estreita proximidade com a superfície celular ou proteínas de matriz extracelular.

**Microvasculatura** – vasos sanguíneos com diâmetro inferior a 100 micrometros.

**Plaqueta** – Fragmento anucleado do citoplasma presente no sangue, apresentando como principal função a formação de coágulos, participando, portanto do processo de coagulação sanguínea.

**Protrombina** - Proteína sanguínea que intervém na coagulação.

**Protrombinase** - Conjunto das substâncias que intervêm na coagulação do sangue ao transformarem a protrombina em trombina.

**Trombocitopenia** – Também chamada de plaquetopenia, é a diminuição do número de plaquetas no sangue.

**Trombo** – Trombo é uma coagulação de sangue no interior do vaso sanguíneo. Ocorre pela agregação plaquetária, diferente do coágulo, que ocorre pela formação de polímeros de fibrinogênio (fibrina). São considerados três tipos de trombo: trombo hemostático, trombo venoso e trombo arterial.

**UI (Unidades Internacionais)** – Unidade utilizada em farmacologia para substâncias cuja atividade biológica não apresenta uma relação bem estabelecida com sua massa.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Coagulação sanguínea .....	16
2.2. Heparina .....	20
2.3. Ácido esteárico .....	23
2.4. PLA – poli(ácido láctico) .....	23
2.5. Nanopartículas.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos .....	27
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	28
4.1. Reagentes .....	28
4.2. Metodologia .....	29
4.2.1. Preparação da heparina.....	29
4.2.2. Síntese do poli(ácido láctico) - PLA .....	30
4.2.3. Síntese dos conjugados com heparina.....	30
4.2.4. Encapsulação do conjugado em nanopartícula de poli(ácido láctico).....	31
4.2.5. Proposta de síntese .....	32
4.2.6. Proposta de reação.....	33
4.3. Caracterização dos materiais.....	35
4.3.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.3.2. Determinação de massa molar por cromatografia de exclusão (GPC) .....	35
4.3.3. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	36
4.3.4. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	36
4.3.5. Difratomia de Raios X (DRX) .....	36
4.3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.3.7. Análise termogravimétrica (TGA) .....	37
4.3.8. Análise granulométrica.....	37

4.3.9. Avaliação da citotoxicidade do conjugado em hemácias .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1. Síntese do PLA – poli(ácido láctico).....	38
5.2. Reação de conjugação .....	39
5.3. Obtenção das nanopartículas .....	40
5.4. Caracterização dos materiais.....	40
5.4.1. Caracterização do poli(ácido láctico) - PLA.....	41
5.4.1.1. Determinação de massa molar por cromatografia de permeação em gel - (GPC) .....	41
5.4.1.2. Demais técnicas (TGA, DSC, GRANULOMETRIA).....	42
5.4.2. Caracterização dos materiais de partida, conjugado e nanopartículas .....	43
5.4.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	43
5.4.2.2. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	44
5.4.2.3. Difractometria de Raios X (DRX) .....	46
5.4.2.4. Análise termogravimétrica (TGA) .....	48
5.4.2.5. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	50
5.4.2.6. Análise granulométrica.....	53
5.4.3. Caracterização das nanopartículas .....	54
5.4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
5.4.3.2. Avaliação da citotoxicidade do conjugado em hemácias .....	55
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Com o advento da química de polímeros biodegradáveis, o interesse pelo desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação de fármacos tem sido crescente. Nos últimos anos, ancorados pela engenharia genética e biotecnologia, muitos trabalhos vêm sendo realizados visando a produção de novos sistemas como alternativa aos convencionais de terapêutica medicamentosa [1, 2].

A terapêutica convencional utiliza moléculas de baixa massa molar no tratamento das doenças o que, se por um lado confere habilidade em atravessar vários compartimentos biológicos e atingir numerosos tipos de células, por outro leva a uma distribuição indiscriminada, diminuindo sua especificidade para um determinado tecido. A baixa especificidade conduz a efeitos indesejados como a necessidade de doses mais altas para se atingir uma resposta farmacológica satisfatória. Esse fato, associado à rápida depuração destas moléculas, leva à necessidade de uma reposição mais frequente do medicamento [3].

Para exercer esse papel, os sistemas de liberação têm se apresentado como uma alternativa interessante. Estes sistemas envolvem aspectos multidisciplinares e oferecem muitas vantagens em relação à terapêutica convencional, sendo as principais: maior eficácia terapêutica, diminuição da toxicidade e proteção da droga contra a degradação. Assim, estes sistemas podem ser projetados para apresentar um maior tempo de permanência na circulação ou, ainda, para o seu direcionamento aos alvos específicos.

Não obstante, a utilização de fármacos encapsulados pode garantir maior conforto e adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Trata-se de uma opção de administração mais acessível como, por exemplo, em tratamentos de trombose venosa profunda, ou profiláticos em pacientes pós-operatórios imobilizados, nos quais se utiliza fármacos como a heparina, cujo modo de uso se restringe por via parenteral.

A heparina pode ser modificada quimicamente (N-dessulfatação e N-acetilação), gerando fragmentos de heparina, as quais apresentam um efeito estimulatório reduzido, sugerindo que os grupamentos sulfato são importante para o mecanismo de estímulo da síntese de PGHS (proteoglicano de heparam sulfato).

Como alternativa eficaz para encapsulação e posterior liberação de fármacos, tem-se investido em compostos poliméricos biodegradáveis e biocompatíveis por resultarem em subprodutos inócuos ao organismo humano. Dentre os polímeros biodegradáveis, destacam-se, na literatura, os derivados do ácido láctico, o poli(ácido láctico), do lactídeo, o poli(lactídeo) e de lactonas, como a poli(caprolactona),

largamente utilizados na área médica e biológica assim como na engenharia de tecidos.

Visando substituir a forma de administração do fármaco heparina utilizado em tratamentos de trombose venosa, por meio de formas tradicionais (endovenosa ou subcutânea), o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma formulação passível de administração oral que apresente as mesmas características anticoagulantes da heparina.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Coagulação sanguínea**

A coagulação sanguínea é um mecanismo fisiológico essencial para a manutenção do equilíbrio entre a hemorragia e a trombose (hemostasia). Em algumas situações, o descontrole desse evento pode levar aos fenômenos hemorrágicos (sangramento) ou à formação de trombos conduzindo a um processo patológico conhecido como trombose, que é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados por efeitos pós-operatórios [4].

Hemostasia é o equilíbrio do fluxo sanguíneo, e envolve diversos processos fisiológicos precisos, que podem levar à coagulação e fibrinólise. Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, as proteínas da coagulação sanguínea, os vasos, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. Esses processos, bem como seus mecanismos são de grande importância para a manutenção do sistema hemostático, pois visam evitar a perda excessiva de sangue, bem como a formação de trombos intravasculares desnecessários [4].

A importância dos vasos sanguíneos foi recentemente entendida, pois atualmente sabe-se que o endotélio, camada de células que delimitam a parede dos vasos sanguíneos, não é simplesmente uma barreira estática e sim dinâmica, pois sintetiza secreta e regula uma variedade de substâncias como óxido nítrico (NO), citocinas, moléculas de adesão e mediadores que irão interagir com diferentes tipos celulares.

Com relação aos componentes proteicos da coagulação sanguínea, em 1964, dois trabalhos distintos propuseram a hipótese de um mecanismo na forma de “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue [5]. Este mecanismo divide a coagulação sanguínea em duas vias, uma via intrínseca, que é iniciada por



componentes exclusivamente intravasculares e outra via extrínseca, a qual se inicia por componentes não presentes no espaço intravascular.

Segundo FRANCO (2000) [6], a iniciação do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (liberação de citocinas), e qualquer que seja o evento desencadeante, a iniciação da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), e sua exposição ao espaço intravascular. O FT, também conhecido como Fator III, é uma glicoproteína de membrana de aproximadamente 45 kDa expressa na maioria das células, porém em maior quantidade nas células que estão em contato com o sangue, como leucócitos e células endoteliais. Células endoteliais e monócitos, que, normalmente, não apresentam o fator tecidual exposto, podem apresentá-lo após uma lesão endotelial ou na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF- $\alpha$  e interleucina-1).

Logo após uma lesão vascular, as plaquetas são ativadas e aderem às fibras colágenas do endotélio. As células endoteliais lesionadas, por sua vez, expõem seus fosfolipídios e FT, os quais servirão como um substrato. O FT e os fosfolipídios, na presença de íons cálcio dão início a ativação do fator VII, tornando ativado (VIIa). O fator VIIa promove a ativação do fator X em fator Xa. Este na presença do fator Va forma o complexo protrombinase, que irá clivar a molécula de protrombina, formando trombina (Fator II). Então, a trombina irá clivar o fibrinogênio (uma proteína solúvel) formando monômeros de fibrina (proteína insolúvel), que irá formar o coágulo (Lopes et al., 2009), conforme ilustrado na Figura 1.

Assim, o objetivo da cascata é converter fibrinogênio em fibrina, para formar uma rede proteica, o coágulo. Este processo ocorre pela amplificação de uma série de reações enzimáticas, nas quais, o produto de uma reação, servirá como enzima para a próxima reação, de tal forma que uma proteína plasmática inativa, após sofrer uma degradação parcial é convertida em proteinase ativa. Desta maneira, estas moléculas circulam em sua forma inativa como profatores ou zimogênios (por ex. XII, XIII, II, etc.) ou cofatores inativos (V e VIII), os quais são ativados por proteólise limitada em fatores ou cofatores ativados, respectivamente. Essas reações levam a uma amplificação em cadeia, cujo objetivo final é a formação de fibrina no local de lesão vascular [7].

A formação do coágulo de fibrina depende de ambos os meios de ativação, tanto extrínseco quanto intrínseco, que são independentes, porém inter-relacionados e iniciados por mecanismos distintos que levarão à formação de um coágulo [7].

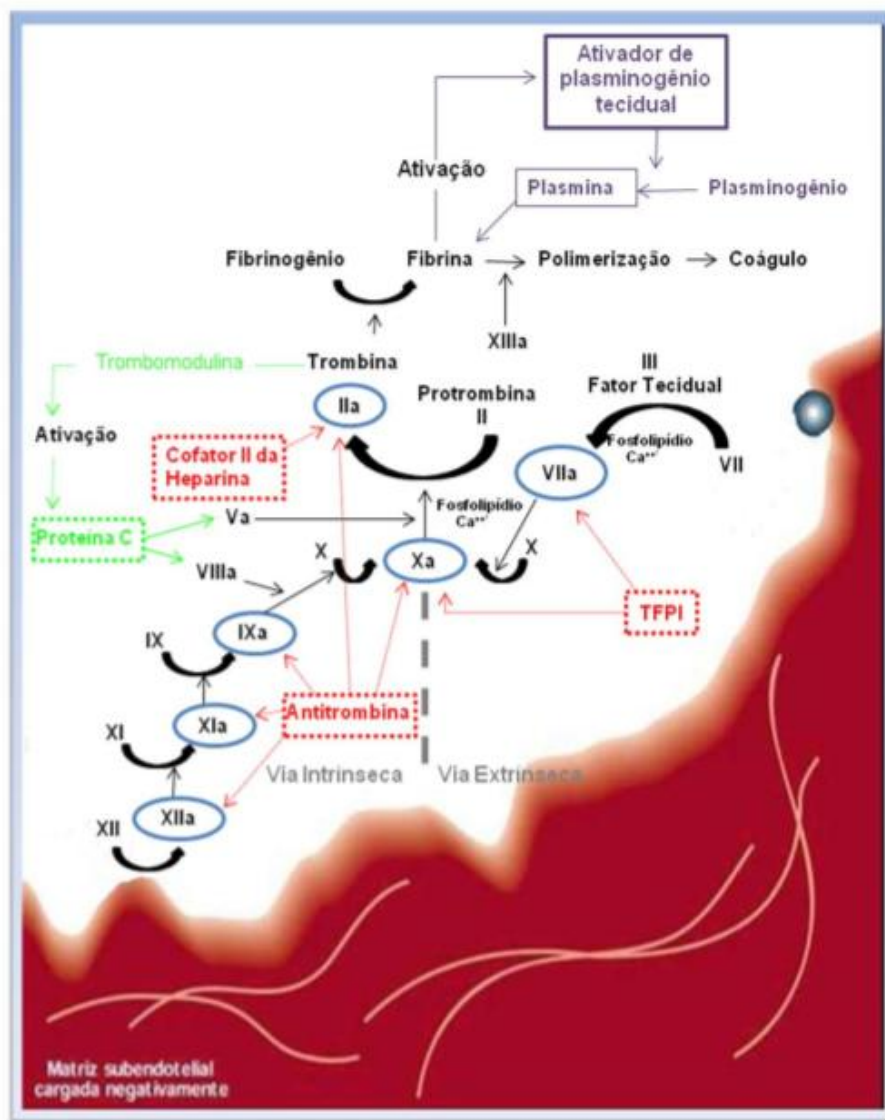


Figura 1- Cascata da coagulação sanguínea.

A Figura acima ilustra as duas vias de iniciação da cascata da coagulação sanguínea, via extrínseca (ativada pela exposição do fator tecidual - III) e via intrínseca (pela ativação do fator XII em XIIa). Os cofatores não ativados e profatores são representados por algarismos romanos e sua forma ativa (cofatores ativos e fatores), por algarismos romanos seguidos da letra "a". [5]

Segundo COLMAN et al. (2006) [8], os eventos relacionados com a coagulação sanguínea são regulados por reações bioquímicas, as quais, em última análise visam controlar a ativação excessiva do sistema, a formação inadequada de fibrina, bem como a oclusão vascular. Assim, o sistema de coagulação sanguínea é controlado por várias proteínas inibitórias, que irão atuar como anticoagulantes naturais. Dentre elas vale destacar o TFPI (inibidor do fator da via tecidual), a proteína C (PC) e a proteína S (PS), e a antitrombina (AT).

O TFPI é um inibidor da cascata da coagulação que atua inibindo a ação da via extrínseca. É uma proteína transmembrânica, produzida pelas células endoteliais, que apresenta três domínios do tipo “Kunitz”. O primeiro domínio liga-se ao complexo fator VIIa/FT, inibindo-o, e o segundo domínio liga-se e inibe o fator Xa. Assim, conversão de protrombina em trombina é inibida, pois Xa estará inativo (BOUÇAS et al., 2006).

Outro regulador importante das reações de coagulação sanguínea é a proteína C (PC), que circula no sangue como zimogênio. As células endoteliais possuem receptores específicos para esta proteína (EPCR, “endothelial PC receptor”), bem como para a trombina (trombomodulina). Quando ambos ligam-se a seus receptores na parede do endotélio, isto é, PC ligada em EPCR e trombina com trombomodulina, ocorre uma proteólise limitada da PC, tornando-a atividade (PCa). Esta interage com o seu cofator, a proteína S (PS), formando um complexo que atua inibindo a coagulação, clivando e inativando os cofatores ativados Va e VIIIa. Assim, PCa atua por um mecanismo de “feedback” negativo, modulando a atividade procoagulante.

A antitrombina (AT) (conhecida anteriormente por antitrombina III), por sua vez, é uma proteína circulante que exerce função inibitória sobre todas as serinoproteases da cascata de coagulação, incluindo os fatores XIIa, XIa, IXa, Xa e IIa (trombina). Assim, a AT modula qualquer atividade enzimática procoagulante excessiva ou indesejável [7].

Considerando que pequenas quantidades de agentes pró-coagulantes podem ativar grande quantidade dos seus substratos, são necessários mecanismos eficientes que limitem o tampão hemostático formado ao tamanho necessário. Os inibidores da coagulação neutralizam os pró-coagulantes ativos para evitar a disseminação descontrolada da coagulação, que levaria a um estado de hipercoagulabilidade, predispondo à trombose [5].

A antitrombina, o mais potente inibidor da coagulação é uma alfa 2-glicoproteína, produzida no fígado. No processo de anticoagulação, ocorre uma reação entre a antitrombina e a trombina, envolvendo a ligação de arginina na antitrombina ao centro ativo serina da trombina, formando um complexo bimolecular. Na ausência da heparina, esse processo ocorre numa taxa relativamente lenta, já na presença da heparina, ocorre a aceleração da formação do complexo inibidor enzimático. O resultado é o aumento da potência inibitória desse complexo.

A Figura 2 mostra, de maneira simplificada, o efeito da heparina sobre a antitrombina, potencializando sua ação.

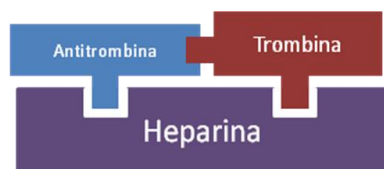


Figura 2 – Diagrama esquemático da interação da heparina com o sistema antitrombina/trombina com base no processo da anticoagulação.

Em condições normais, o sistema de coagulação predomina no sentido da coagulação. Nos casos de trombose, ou seja, quando há um desequilíbrio da hemostasia, levando à formação de trombos ou coágulos, é imperativo o tratamento profilático, para o qual a heparina ainda é o anticoagulante de escolha.

## 2.2. Heparina

A heparina, cuja unidade repetitiva está representada na Figura 3 é composta por unidades hexassacarídicas octossulfatadas repetitivas, constituída essencialmente de dois tipos de dissacarídeos: um trissulfatado e outro dissulfatado, respectivamente na proporção 2:1. Assim as cadeias de heparina são constituídas de dissacarídeos contendo ácido urônico e  $\alpha$ -D-glicosamina. Os resíduos de ácidos urônicos são do tipo  $\alpha$ -L-idurônicos (70-80%) e  $\beta$ -D-glucurônico (20-30%), sendo que a maioria dos resíduos de ácido L-idurônico são sulfatados no carbono 2 (C-2, sendo 70-80%), enquanto que o ácido D-glucurônico, raramente encontra-se sulfatado. As ligações glicosídicas intradissacarídicas são do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  ou  $\beta(1\rightarrow4)$  e as interdissacarídicas são do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  [9].

A heparina é um glucosaminoglicano sulfatado (mucopolissacarídeo), de ocorrência natural, que apresenta massa molar média de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ . A vantagem de sua administração se deve ao fato de ser um dos mais potentes anticoagulantes conhecidos, tornando-a amplamente utilizada na terapêutica de diversas doenças e alterações hematológicas [10].

É caracterizada como um anticoagulante indireto que depende de cofatores plasmáticos para expressar sua atividade [9]. Assim, a ação anticoagulante da heparina é observada quando esta forma um complexo ternário com a AT, potencializando em cerca de 2000 vezes a ação inibitória sobre as serinoproteases (XIIa, XIa, IXa, Xa e IIa). Atua também ligando com o Cofator II da heparina, inibindo a ação da trombina.

Heparina também induz a secreção de um fator tecidual inibidor da cascata de coagulação (o TFPI) através das células endoteliais, sendo que ocorre uma redução da atividade pró-coagulante do fator tecidual VII, e isto pode contribuir para a ação antitrombótica da heparina [9].

Liga-se às plaquetas e, dependendo das condições experimentais *in vitro*, pode inibir ou induzir a agregação plaquetária. A heparina prolonga o tempo de sangramento (TS) em humanos e aumenta a perda sanguínea na microvasculatura de coelhos. A interação dessa molécula com as plaquetas e células endoteliais pode contribuir para a hemorragia induzida pela heparina, através de um mecanismo independente do seu efeito anticoagulante. A função plaquetária dependente do fator de von Willebrand, também pode ser inibida, tendo em vista a interação da heparina com este fator plasmático.

As preparações de heparina foram introduzidas a prática clínica há mais de 60 anos, sendo obtidas de mucosa intestinal suína ou bovina e de pulmão bovino [9]. A heparina é bastante heterogênea com relação ao tamanho da molécula, o que interfere com a sua atividade anticoagulante e suas propriedades farmacocinéticas.

Como desvantagens do tratamento com a heparina podem ser citadas:

- a administração, que ocorre somente de forma endovenosa ou subcutânea. Esta forma de administração se deve à sua natureza hidrofílica e à alta massa molar do fármaco que, caso administrada por via oral, seria degradada no pH ácido estomacal, além da dificuldade de sua absorção entérica,
- o desconforto e os hematomas locais causados por este tipo de administração comprometem a adesão do paciente [11],
- a dose-resposta variável, o que exige um monitoramento laboratorial constante, além da possibilidade de desenvolvimento da trombocitopenia [12] (redução do número de plaquetas no sangue) em um número significativo de pacientes que fazem tratamento prolongado com heparina [11,13].

As HEPARINASES I e II apresentam biodegradação irregular por uma enzima hepática, o heparanosulfato [14, 15], sendo removida da circulação pelas células reticuloendoteliais e pelo endotélio.



### 2.3. Ácido esteárico

Pertencente à função dos ácidos carboxílicos, o ácido esteárico (ácido octadecanoico) (Figura 4) pode ser considerado uma mistura de ácidos graxos sólidos. É obtido de matérias graxas que são constituídas principalmente de ácido palmítico e ácido esteárico, provenientes de gorduras animal ou vegetal.

O comportamento do ácido esteárico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ) é especialmente único nos efeitos sobre os níveis de colesterol no sangue [20]. Estudos experimentais em animais e humanos sugerem que a ingestão de ácido esteárico tem efeito neutro nos níveis de colesterol.

Apesar deste efeito neutro sobre os lipídios do sangue, sua atuação sobre a coagulação sanguínea é menos clara. Estudos recentes indicam um efeito benéfico do ácido esteárico no processo de coagulação, porém nenhum resultado foi publicado até o presente momento.

Devido a estas características do ácido esteárico: origem vegetal ou animal, neutralidade no organismo humano, por ser atóxico e facilmente metabolizado, este foi escolhido como reagente para a conjugação com a heparina e formulação de um novo material com características anticoagulantes.

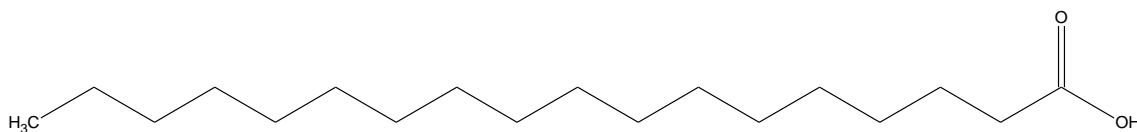


Figura 4 – Representação da estrutura química do ácido esteárico.

### 2.4. PLA – poli(ácido láctico)

Uma classe de polímeros sintéticos que apresenta grande interesse por sua biodegradabilidade e biocompatibilidade é a dos poliésteres, que compreende todos os polímeros que contêm o grupo funcional éster na cadeia principal. Sendo assim, uma grande quantidade de estruturas químicas pode se ligar a estes grupos, possibilitando a formação de uma diversidade de poliésteres com características distintas. Dentro deste contexto, pode ser citado, em especial, o poli(ácido láctico) ou polilactídeo [21].

O poli(ácido láctico) é um polímero com grandes aplicações nas áreas médica, odontológica e farmacêutica [22]. Um fator relevante é a massa molar desse polímero, que deve ser suficientemente elevada (acima de  $100.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e apresentar dureza alta o bastante para ser utilizado em próteses cirúrgicas. Por outro lado, uma massa molar não tão elevada (em torno de  $5.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), é indicada para o uso como sistema polimérico para a liberação de fármacos. Nesta aplicação, os polímeros são facilmente degradados formando subprodutos inócuos (como o ácido láctico), os quais são gradualmente absorvidos pelo organismo [23].

Existem duas formas de obtenção do PLA (Figura 5). A primeira delas é a polimerização direta do ácido láctico por policondensação (rota 1), sendo utilizado vácuo e alta temperatura. Dessa forma são obtidos polímeros de massa molar média mais baixa em torno de  $2.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , o que limita sua aplicação [24].

Outra forma de obtenção do polímero é através de um dímero cíclico do ácido láctico previamente obtido, o lactídeo (rota 2). Neste caso, a polimerização por poliadição ocorre por abertura do anel, sendo, em geral, empregados catalisadores metálicos no processo, resultando em polímeros com massas molares médias mais elevadas (por volta de  $15.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) [25].

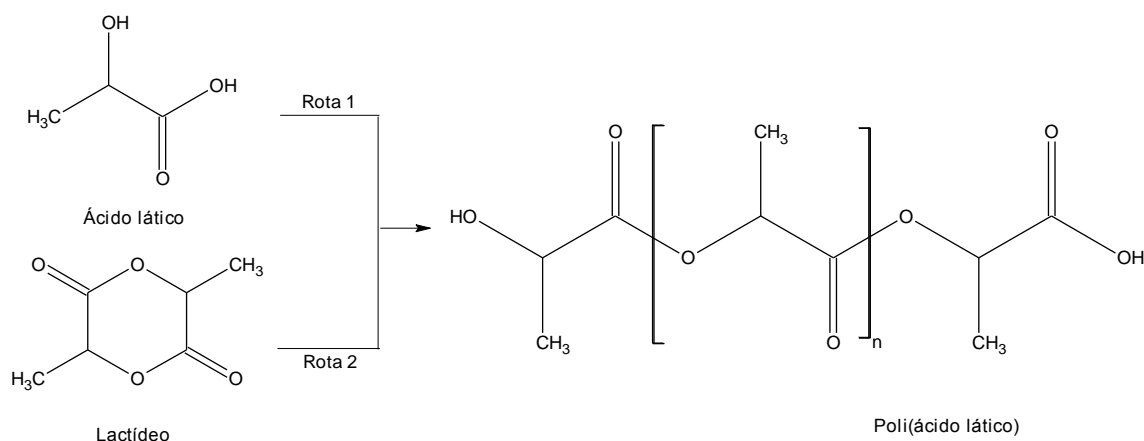


Figura 5 – Representação esquemática dos métodos de obtenção e da estrutura química do poli(ácido láctico) [27].

O PLA tem propriedades ópticas, físicas, mecânicas e de barreira razoavelmente boas quando comparadas aos polímeros de origem petroquímica. Além disso, apresenta, como vantagens, biodegradabilidade e baixa toxicidade, que lhe permite ser usado em embalagens de alimentos e outros produtos de consumo [26, 27]. Sua excelente bioabsortividade e biocompatibilidade proporcionam inúmeras



aplicações na área biomédica como em próteses ósseas, suturas, sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos [28, 29]. Os sistemas de liberação de fármacos despertam grande interesse científico pela característica de seletividade para levar o fármaco até o local específico de ação e por um tempo prolongado, sendo possível a liberação mais lenta do princípio ativo [30].

As características e aplicações dos polímeros também podem ser influenciadas pelos grupos terminais. Vários autores têm estudado a influência destes parâmetros na degradação de polímeros bem como em suas atividades biológicas [31].

A matriz polimérica a partir do PLA é degradada por hidrólise no interior do organismo humano, resultando em cadeias progressivamente menores e mais biocompatíveis [32]. Os polilactídeos, poliglicolídeos ou seus copolímeros, formam subprodutos como ácido lático ou glicólico, que entram no ciclo de Krebs [33], sendo posteriormente transformados em dióxido de carbono e água os quais são excretados [34]. Este fato viabiliza o uso do PLA para a encapsulação do fármaco heparina, foco deste trabalho.

O polímero obtido pode apresentar diferentes taticidades (regularidade espacial com que grupos laterais são alocados na cadeia polimérica), dependendo do tipo de monômero envolvido (ácido lático ou lactídeo) e das condições de reação de polimerização aplicadas [35].

O uso de catalisadores estereoespecíficos pode levar à homotaticidade do poli(lactídeo) PLAC, que lhe confere alto grau de cristalinidade e, portanto, tornando-o mais específico em suas aplicações comparativamente aos polímeros plásticos já consagrados na literatura [36].

Especificamente, o presente trabalho visou desenvolver um produto que possa vir a apresentar atividade anticoagulante, encapsulado em poli(ácido lático) sintetizado a partir do ácido lático.

## **2.5. Nanopartículas**

As nanopartículas geralmente apresentam tamanho entre 10nm e 1000nm. Em sua preparação, o fármaco é dissolvido em solvente apropriado, aprisionado (encapsulado ou ligado à matriz polimérica) e, dependendo do método de preparação, podem ser obtidas nanoesferas ou nanocápsulas [37].

Nanoesferas são sistemas matriciais em que a droga é fisicamente aprisionada na matriz, ou uniformemente solubilizada na estrutura polimérica (Figura 6), enquanto nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a substância, em geral lipofílica, é

confinada em uma cavidade preenchida com óleo ou emulsão e rodeada por uma membrana polimérica única, ambas suspensas coloidalmente em meio externo aquoso [37, 38].

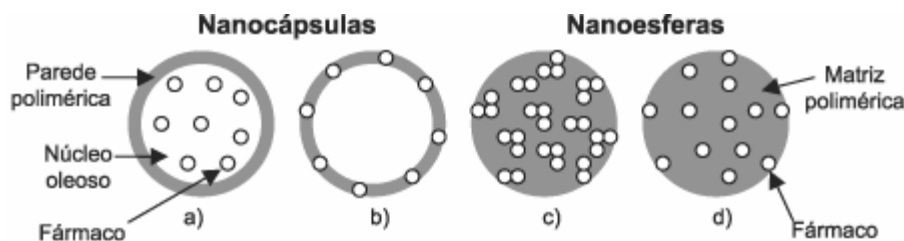


Figura 6 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas:  
a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

O desenvolvimento de nanopartículas, a partir de um polímero que aprisione um fármaco, para o sistema de liberação, é foco de estudo e interesse em áreas biológicas em parceria com a química de polímeros [38].

Para esta aplicação, polímeros biodegradáveis vêm ganhando destaque, pois possuem grupos hidrolisáveis cujos produtos sofrem ação metabólica de organismos vivos. Dentre estes polímeros, o poli (ácido lático) ou polilactídeo têm sido largamente usados na área médica em função de suas características de biocompatibilidade, biodegradação e reabsorção em meio aquoso [39, 40].

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído muito a atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas (substâncias biologicamente ativas devido à sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos). Este fato é devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade no organismo humano e durante o armazenamento, à preparação rápida e fácil, e ao baixo custo quando comparadas aos lipossomas.

Yildiz *et al.* sintetizaram microesferas carregadas com heparina de forma a proporcionar a absorção do fármaco através da mucosa nasal. As microesferas foram preparadas com poli(ácido lático) em diferentes proporções de polímero/fármaco (1:10, 1:2,5 ou 1:1). As microesferas foram analisadas *in vivo* e indicaram que podem ser utilizadas por via nasal, na forma de aerossol, como alternativa à parenteral [41, 42].

Jee *et al.* propuseram um material conjugado entre heparina e um polímero biodegradável, o polilactídeo. As caracterizações do material indicaram que a incorporação da heparina deixou a superfície do polímero mais hidrofílica e estudos *in vitro* indicaram a manutenção da atividade anticoagulante do conjugado [43].

Similarmente ao reportado na literatura, este trabalho propõe a preparação de um conjugado, formulado a partir do fármaco heparina e do ácido esteárico, que seja encapsulado em poli(ácido láctico) e apresente atividade anticoagulante.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar formas encapsuladas de conjugados entre heparina e ácido esteárico em poli(ácido láctico), passíveis de administração oral.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Sintetizar poliésteres biodegradáveis utilizando, como monômero, o ácido láctico.

Promover a alteração do caráter hidrofílico da molécula de heparina formando conjugados com ácido esteárico.

Caracterizar os materiais obtidos.

Produzir micro/nanopartículas contendo heparina utilizando o polímero sintetizado, aplicando a técnica de emulsão simples com evaporação do solvente.

Preparar micro/nanopartículas através do processo de nanoprecipitação utilizando o conjugado heparina-AE.

Proceder a caracterização das micro/nanopartículas obtidas pelos métodos de emulsão e nanoprecipitação.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reagentes

Os principais reagentes químicos empregados no desenvolvimento deste trabalho estão abaixo relacionados:

- *Ácido clorídrico (HCl)*: MM = 36,4 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Biotec. Utilizado como recebido.
- *Ácido esteárico (AE)*: MM = 284,5 g.mol<sup>-1</sup>. Grau de pureza: 99%. Procedência: Biotec. Utilizado como recebido.
- *Ácido láctico – D,L (AL)*: MM = 90,08 g.mol<sup>-1</sup>. Solução aquosa 85% (m/v). Utilizada como recebida.
- *Diciclohexil carbodiimida (DCC)*: MM = 206,33 g.mol<sup>-1</sup>, Procedência: Acros. Grau de pureza: 99%. Utilizado como recebido.
- *Diclorometano*: MM = 84,93 g.mol<sup>-1</sup>, Procedência: Proquimios. Grau de pureza: 99%. Utilizado como recebido.
- *Dimetil aminopiridina (DMAP)*: MM = 122,17 g.mol<sup>-1</sup>, Procedência: Acros. Grau de pureza: 99%. Utilizada como recebida.
- *Dimetilformamida (DMF)*: MM = 73,09 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Vetec. Grau de pureza: 99,8 %. Utilizada como recebida.
- *Dimetilsulfóxido (DMSO)*: MM = 78,13 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Vetec. Grau de pureza: 99%. Utilizada como recebida.
- *Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6)*: MM = 84,17 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Merck. Utilizado como recebido.
- *Heparina sódica*: solução aquosa contendo 5000 UI.ml<sup>-1</sup> por ampola. Procedência: Parinex®.

- Metanol: MM = 32,04 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Dinâmica. Grau de pureza: 99,8%. Utilizada como recebida.
- Nitrogênio gasoso: Procedência: White Martins.
- Óxido de deutério (D<sub>2</sub>O): MM = 20,03 g.mol<sup>-1</sup>. Procedência: Merck. Utilizado como recebido.
- Poli(álcool vinílico): MM = 13000 a 23000 g.mol<sup>-1</sup>, Procedência: Fluka. Utilizado como recebido.
- Tetrahidrofurano (THF): MM = 72,11 g.mol<sup>-1</sup>, Procedência: Dinâmica – Química Contemporânea Ltda. Grau de pureza: 99%. Utilizado como recebido.

## 4.2. Metodologia

As metodologias utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Polímeros Sintéticos do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

### 4.2.1. Preparação da heparina

A heparina foi adquirida previamente na forma de solução aquosa, comercializada pela Parinex<sup>®</sup>, em ampolas de 5 mL e apresentando uma composição de 5000 U.I (unidades internacionais). No entanto, o fármaco foi utilizado na forma sólida para o desenvolvimento do trabalho.

Para tanto, foi utilizado o processo de liofilização, também conhecido por “freeze-drying”, que consiste na desidratação sem aquecimento. O fármaco, solução aquosa de heparina, foi congelado numa temperatura ideal (-15°C) e posteriormente a água foi eliminada por sublimação (passagem direta do estado sólido para o gasoso), através de um controle rigoroso de alto vácuo.

A secagem da solução aquosa de heparina foi realizada em liofilizador Jouan LP3<sup>®</sup> modelo 60, durante 24 h a 0,1 mbar e – 45 °C.

Após o processo de liofilização não foi verificada a atividade da heparina, visto que não se realizou posteriormente, análises *in vitro* ou *in vivo* para esta característica.

#### 4.2.2. Síntese do poli(ácido láctico) - PLA

A síntese do poli(ácido láctico) (PLA) foi conduzida por meio da reação de policondensação de uma mistura de isômeros D e L do ácido láctico em solução aquosa 85% (m/v) (VETEC®). Foram colocados 200 mL de solução de D,L-ácido láctico em balão de duas bocas de 500 mL, ao qual foi adaptado um sistema de destilação para a condensação da água vaporizada. O balão, contendo a mistura reacional, foi mantido sob agitação magnética a 180 °C, empregando uma placa de aquecimento FISATOM® (modelo 752A). Ao sistema reacional foi aplicada uma redução de pressão de  $350 \pm 10$  mmHg, utilizando uma bomba de vácuo PRISMATEC® (modelo 131). A reação foi conduzida pelo tempo de 8 horas [44].

Após a síntese, o PLA foi dissolvido em acetona P.A. e precipitado em água destilada gelada e filtrado. Posteriormente, o polímero foi colocado em estufa, a 50° C, para secagem.

#### 4.2.3. Síntese dos conjugados com heparina

A reação de conjugação foi preparada a partir do ácido esteárico (AE) e da heparina. Como sistema catalítico foi utilizado diciclohexil carbodiimida (DCC) e dimetil aminopiridina (DMAP). Em um balão de 200 mL foi adicionado o ácido esteárico (AE), heparina dissolvida em 2mL de dimetilsulfóxido P.A. e quantidades analíticas de DMAP, as quais foram dissolvidas completamente em dimetilformamida (DMF). Posteriormente foi adicionado DCC em excesso mol com relação ao material base.

A reação foi mantida à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>, por 12 horas. Após o tempo de reação, a solução foi filtrada. Ao filtrado foi adicionado 0,5 mL de água para a precipitação do DCC residual, na forma de diciclo-hexilureia. Procedeu-se uma nova filtração e adicionou-se ao filtrado, lentamente, 10 mL de água, o que resultou na precipitação do conjugado. O material foi separado por filtração e seco à temperatura ambiente.

Para uma análise comparativa entre os produtos e os conjugados foram preparadas e caracterizadas misturas físicas entre o ácido esteárico (70%) e a heparina (30%).

A Figura 7 mostra, de forma simplificada, o fluxograma que representa a síntese dos conjugados de heparina.

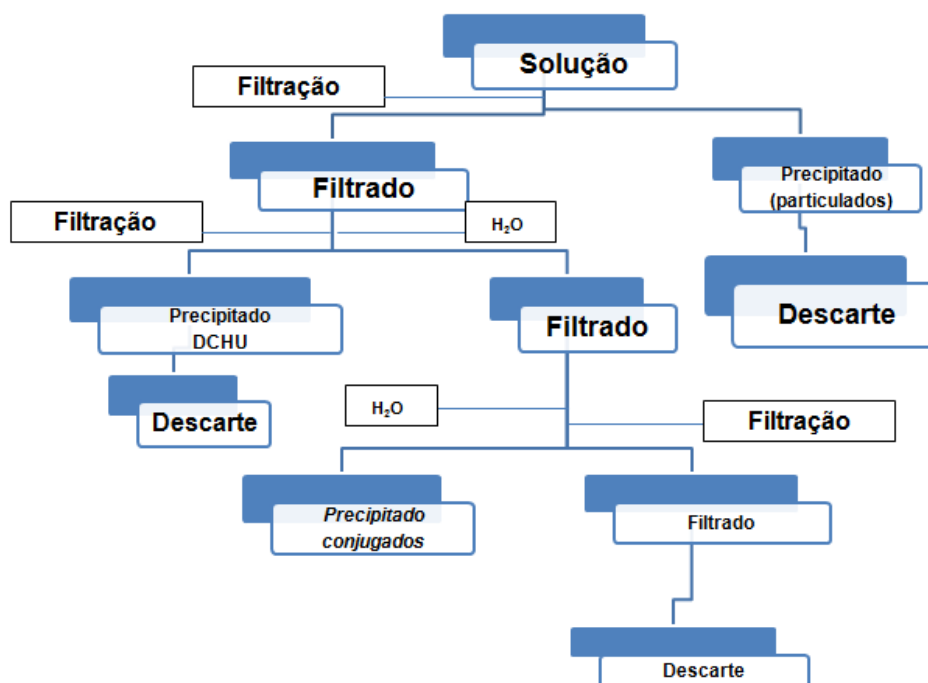


Figura 7 – Fluxograma da síntese de conjugados de heparina.

#### 4.2.4. Encapsulação do conjugado em nanopartículas de poli(ácido láctico)

As nanopartículas poliméricas contendo o conjugado foram formuladas através do método da emulsão simples com evaporação do solvente a partir do polímero poli(ácido láctico) – PLA conforme preconizado na literatura [45]

Em um volume de 40 mL de clorofórmio foram solubilizados simultaneamente 2g do PLA, originando uma solução 5% (m/V) e 0,60g do conjugado com heparina. Posteriormente, a solução inicial foi adicionada sobre 50 mL de uma solução aquosa de PVAI a 2% (m/V) sob vigorosa agitação mecânica de 22000 rpm por 5 minutos, sendo utilizado um dispersor de alta velocidade (Ultra-turrax, modelo T18 N, IKA), a uma temperatura de 35°C.

Com a formação de uma emulsão estável (ausência de separação de fases), o solvente (clorofórmio) foi evaporado totalmente em capela sob agitação de 800 rpm por 4 horas. A suspensão de nanopartículas foi centrifugada em 15000 rpm por 15 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi armazenado em frascos separados e as

nanopartículas foram lavadas duas vezes com água destilada para retirada do resíduo de PVAI. Após cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm durante 10 minutos, com posterior eliminação da água residual. As nanopartículas foram secas em placas de Petri sob temperatura ambiente, para posterior caracterização.

#### 4.2.5. Proposta de síntese

A reação proposta pode conduzir à vários produtos já que existe um grande número de grupamentos presentes na molécula de heparina (-OH, -CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H, -COOH, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Estes podem reagir com a terminação carboxila (COOH) do ácido esteárico sendo que as possíveis reações e estruturas estão esquematicamente representadas na Figura 8.

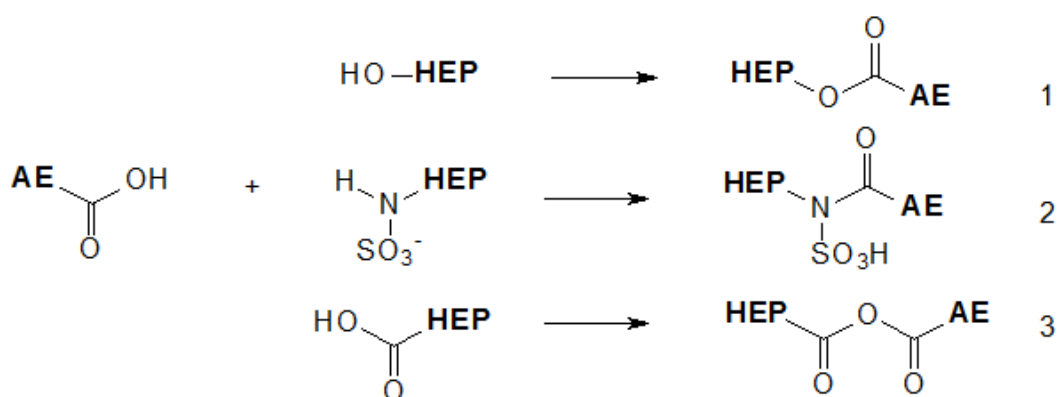


Figura 8 – Representação esquemática das possíveis estruturas dos materiais derivados de heparina e ácido esteárico.

Das estruturas propostas, a rota sugerida em (1) foi adotada como a mais provável, por apresentar o nucleófilo mais forte e, foi usada para a proposta do mecanismo.



#### 4.2.6. Proposta de reação

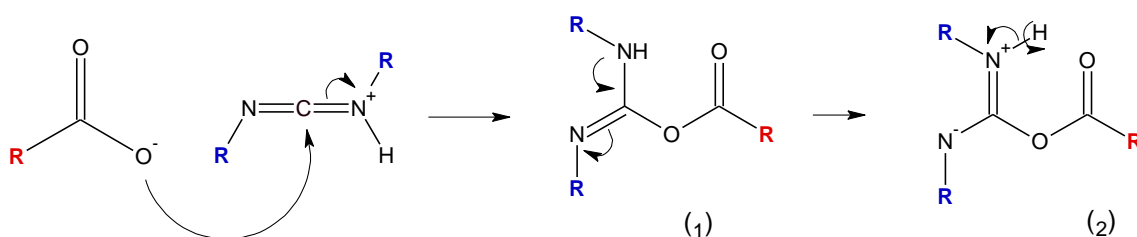
O conjugado de heparina com ácido esteárico foi resultante de uma reação catalisada por dimetil aminopiridina (DMAP) e dicicloexil carbodiimida (DCC).

O seguinte mecanismo é proposto para a conjugação entre heparina e ácido esteárico, considerando que, como proposta, preferencialmente ocorre a conjugação entre a carboxila deste com a hidroxila da heparina.

Inicialmente o grupo carboxilato do ácido esteárico promove um ataque nucleofílico ao carbono parcialmente positivo do DCC. Este processo leva à ruptura da ligação  $\pi$  entre (C – N), o que promove a neutralização da carga positiva no nitrogênio, gerando o intermediário (1).

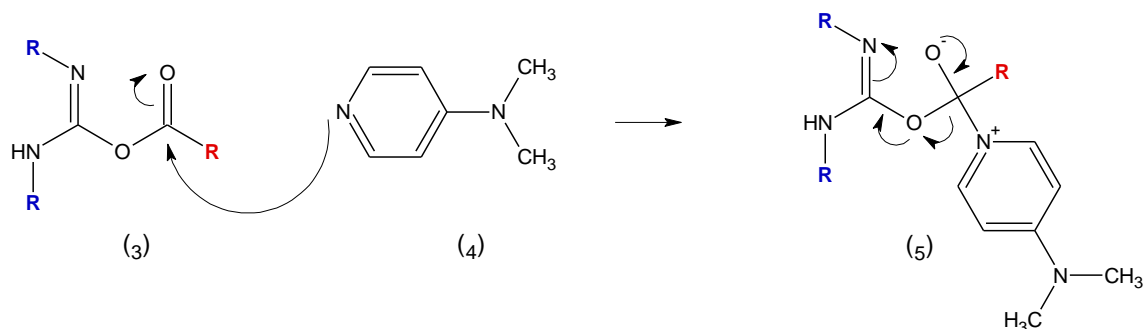
Ocorre um rearranjo do intermediário, sendo que o par de elétrons do nitrogênio, ligado ao carbono por ligação simples, é utilizado na formação da ligação  $\pi$  (1) entre ambos e a ligação  $\pi$  da outra ligação (C – N) é rompida formando o intermediário (2).

O nitrogênio carregado negativamente abstrai o hidrogênio do elemento nitrogênio carregado positivamente, neutralizando a carga formando o intermediário (3). Este passo ocorre com o auxílio do solvente.

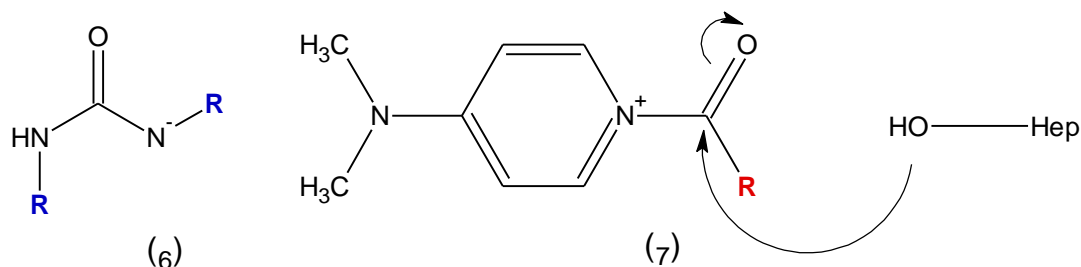


O par de elétrons da ligação  $\pi$  entre (C – O) é deslocalizado em direção ao oxigênio em (3) que é mais eletronegativo, já que simultaneamente o carbono parcialmente positivo é atacado pelo nucleófilo que é o catalisador (4), formando o intermediário (5).

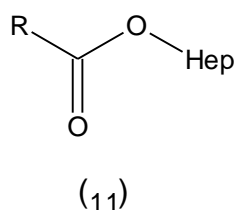
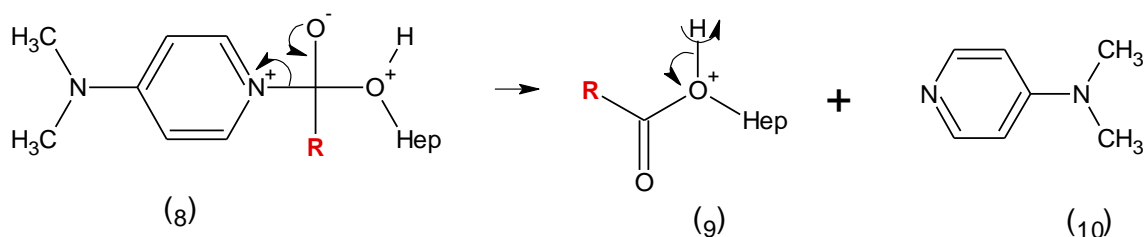
Os elétrons do oxigênio, parcialmente negativo em (5) são deslocados a fim de formar uma ligação  $\pi$  entre (O – C). De maneira simultânea, a ligação  $\sigma$  entre (C – O) é rompida originando as estruturas (6) e (7).



A formação do conjugado ocorre a partir do ataque à carbonila do intermediário (7) pela hidroxila da heparina. O par de elétrons da ligação  $\pi$  da carbonila do intermediário (7) é deslocado em direção ao oxigênio, uma vez que ocorre o ataque nucleofílico da hidroxila da heparina ao centro de carga positiva (C) da carbonila, gerando o intermediário (8).



O oxigênio de (8), com carga negativa, reestabelece a ligação  $\pi$  (C – O), liberando o catalisador (10) e a estrutura (9) que é o precursor do conjugado. Este terá os elétrons da ligação sigma entre (O – H) direcionados para o oxigênio, átomo mais eletronegativo, promovendo a estabilidade eletrônica e formando efetivamente o conjugado (11). Esta etapa ocorre com o auxílio de uma base presente no meio, provavelmente a estrutura formada como intermediário (6).



### **4.3. Caracterização dos materiais**

#### **4.3.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

As análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em espectrômetro Bomem da Hartmann & Braun, com transformada de Fourier (FTIR), modelo B-100, com 32 scans (DQUI-UFPR). As amostras do ácido esteárico (AE), do polímero poli(ácido láctico) e PLA e do conjugados (heparina-AE), foram analisadas na forma de pastilhas prensadas em KBr.

#### **4.3.2. Determinação de massa molar por cromatografia de permeação em gel - (GPC)**

O preparo da amostra foi realizado com a pesagem dos polímeros, os quais foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF). Após a completa dissolução, o material foi filtrado em filtro de seringa de 13 mm, com membrana de teflon e porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  (millipore). O filtrado foi recebido em frasco para análise (vial), fechado e armazenado até injeção. O mesmo procedimento foi aplicado aos padrões de poliestireno de massa molar conhecida, sendo cada padrão preparado em balão independente para calibração.

A cromatografia foi realizada em dois sistemas. No primeiro, o foco foi a determinação da massa molar com base no detector de espalhamento de luz, enquanto que, no segundo, foi empregado o método da calibração universal. O sistema 1 foi composto por um cromatógrafo líquido Viscotek, equipado com uma coluna Viscotek I-MBLMW-3078 (300 x 7,8 mm), e detectores por índice de refração, viscosidade, UV e espalhamento de luz. A fase móvel empregada foi o tetrahidrofurano a uma vazão de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperaturas da coluna e do detector refração 30 °C. O sistema 2 foi composto por um cromatógrafo líquido Waters 1515, com detector por índice de refração (Waters 2487) e colunas TSK 1000 e Styragel 100 acopladas em série. A fase móvel, tetrahidrofurano (THF), foi empregada a uma vazão de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e temperatura das colunas ajustadas a 40 °C.

O valor empregado de  $dn/dc$  (taxa de resposta do detector do índice por refração em relação à concentração) do poli(ácido láctico) em THF foi de 0,042  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , e as constantes de Mark-Houwink,  $a = 0,689$  e  $K = 2,59 \times 10^{-4}$  [46]. De posse destas constantes, foi possível o cálculo dos valores de  $M_n$  (massa molar numérica média) e

Mw (massa molar ponderal média) pelo método de calibração universal que emprega o poliestireno, assim como a calibração absoluta através do detector de espalhamento de luz.

#### **4.3.3. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial - (DSC)**

A análise por DSC foi realizada no equipamento Netzsch modelo 200 F3 Maia e as amostras foram submetidas à programação de temperatura de aquecimento e de resfriamento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  e varredura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uma massa de 10 mg da amostra foi pesada e colocada em cadinho de alumínio fechado, sendo levada ao aparelho juntamente com um cadinho vazio como referência. A análise foi realizada sob fluxo de  $\text{N}_2$  a uma taxa de  $50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$  [47]

#### **4.3.4. Ressonância magnética nuclear - (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) foram obtidos em espectrômetro de RMN Bruker AVANCE® 400. Foram utilizados tubos de vidro de 5 mm de diâmetro, clorofórmio deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ) ou água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

#### **4.3.5. Difratometria de raios-X - (DRX)**

Os materiais foram analisados no difratômetro de raios-X Shimadzu XRD-6000, scan de  $2^{\circ}.\text{min}^{-1}$  e  $2\theta$  de  $5^{\circ}$  a  $55^{\circ}$ , radiação  $\text{K}\alpha$  de cobre ( $\lambda=1.5418\text{ \AA}$ ), corrente de 40 mA e voltagem 40 KV, para a observação dos perfis de difração e avaliação da morfologia do material.

#### **4.3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A avaliação morfológica e de superfície das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no CME (Centro de Microscopia Eletrônica) da UFPR. As nanopartículas foram levadas à estufa a vácuo e, posteriormente, fixadas em suporte metálico. Na sequência, foram submetidas à metalização com ouro no

equipamento Balzers Sputtering SCD-030. As micrografias foram obtidas após a visualização das amostras em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV, sendo empregadas voltagens de 10 ou 15 kV.

O registro das imagens foi realizado por meio da utilização de software específico instalado no equipamento.

#### 4.3.7. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento NETZSCH TG-209, com porta amostra de alumina e atmosfera inerte de N<sub>2</sub> com fluxo de 100 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial foi de 0°C e a final foi de 790°C, com taxa de aquecimento de 20°C.min<sup>-1</sup>. Esta análise foi realizada no Laboratório de Análises de Rochas e Minerais (LAMIR).

#### 4.3.8. Análise granulométrica

A distribuição de tamanho (granulométrica) das partículas foi realizada no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) – UFPR. As análises foram feitas em granulômetro a laser sendo que, para este procedimento, foi necessário preparar dispersões estáveis (turvas) das partículas em água deionizada, realizadas no próprio equipamento, com ajuda de ultrassom ativo durante 60 segundos. Para calibrar o aparelho foi adicionada água deionizada (branco). O equipamento opera sob uma faixa de detecção entre 0,04 e 500 µm.

A partir da suspensão homogênea obtida, através de software instalado no equipamento, o diâmetro médio e a distribuição do tamanho das nanopartículas foram determinados.

Para determinar se as partículas obtidas são uniformes, foi utilizada a Equação 1, a qual resulta em um valor de Span a título de comparativo.

$$\text{Span} = d(v,90\%) - d(v,10\%) / d(v,50\%) \text{ (Equação 1)}$$

Sendo que: d = diâmetro das partículas e v = volume analisado.

#### 4.3.9. Avaliação da citotoxicidade do conjugado em hemácias

A ação citotóxica do conjugado foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado (Newprov). Inicialmente, o sangue foi centrifugado a  $1500 \text{ rev.min}^{-1}$  para separação do plasma. Em seguida, as hemácias foram lavadas por centrifugação ( $1500 \text{ rev.min}^{-1}$ ) em solução tampão fosfato pH 7,4 ( $\text{NaCl } 0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) por três vezes. As hemácias foram ressuspensas com a solução tampão para obtenção de uma suspensão a 5%.

Soluções do conjugado a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  em DMSO ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) foram incubadas com  $900 \text{ }\mu\text{L}$  da suspensão de hemácias a 5%, por um período de 24 horas a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Ao final do tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a  $1500 \text{ rev.min}^{-1}$  por 5 min. Paralelamente, nas mesmas condições, foi realizado o controle, constituído por  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de DMSO e  $900 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de hemácias. Os tubos contendo a suspensão de hemácias sem o conjugado foram considerados como branco. Para determinar a quantidade de hemoglobina liberada, foram feitas medidas das absorbâncias do sobrenadante empregando um comprimento de onda  $540 \text{ nm}$  empregando o espectrofotômetro UV-Vis – modelo QuickLab (Drake - São Paulo, Brasil). A análise foi realizada em triplicata. Os grupos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey.

O presente ensaio foi realizado no laboratório de Ciências Farmacêuticas da UEPG (Universidade Estadual de Ponta Grossa) sob responsabilidade da Professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Síntese do poli(ácido láctico) – PLA

A síntese do poli(ácido láctico) foi realizada por policondensação, amplamente difundida na literatura. Esta polimerização é uma esterificação, em que um álcool reage com um ácido orgânico, formando um éster com a consequente eliminação de água. Nesse tipo de reação, os grupos químicos responsáveis pela reação são os grupos hidroxila (OH) e o carboxila (COOH).

A polimerização por condensação do ácido láctico resulta em um polímero biodegradável, absorvível, renovável além de termoplástico. Requer um monômero de alta pureza, uma vez que as impurezas interferem no curso da reação e reduz a qualidade do polímero [23].

O PLA sofre degradação principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações éster, formando grupos terminais carboxila e hidroxila.

O material obtido apresentou-se na forma de um sólido branco (Figura 9) e foi empregado nas reações com heparina para a preparação dos conjugados.



Figura 9 – Material obtido através da polimerização do ácido láctico.

## 5.2. Reação de conjugação

De maneira geral, o produto (conjugado) obtido através da reação citada apresentou-se na forma de pó branco insolúvel em água, cujo aspecto pode ser observado na Figura 10.



Figura 10 – Material obtido através da reação de conjugação AE-heparina.

### 5.3. Obtenção das nanopartículas

De maneira geral, as nanopartículas tendem a adquirir, a exemplo das gotas de água, formas esféricas, que correspondem à situação de menor energia. A obtenção preferencial de partículas não esféricas exige, portanto, interferência externa.

A constatação de sua morfologia pode ser avaliada por MEV, conforme discutido mais adiante, porém o aspecto físico macroscópico do material obtido após a técnica de nanoprecipitação foi a de um sólido branco pulverulento (Figura 11).



Figura 11 – Aspecto das nanopartículas obtidas.

### 5.4. Caracterização dos materiais

Para a devida caracterização dos materiais, foram utilizadas técnicas convencionais, as quais estão dispostas na Tabela 1 abaixo. Vale ressaltar que nem todas as técnicas foram aplicadas para todos os materiais usados neste trabalho.

TABELA 1  
Técnicas de caracterização empregadas

Material	Técnica empregada
PLA	GPC, TGA, DSC, GRANULOMETRIA
HEPARINA	FTIR, RMN, DRX, TGA, DSC
AE	FTIR, RMN, DRX, TGA, DSC
CONJUGADO HEP-AE	FTIR, RMN, DRX, TGA, DSC, GRANULOMETRIA
NANOPARTÍCULAS	TGA, DSC, MEV, GRANULOMETRIA



Os resultados destas análises serão discutidos em conjunto, quando apropriado, nos itens a seguir.

#### **5.4.1. Caracterização do PLA**

##### **5.4.1.1. Determinação de massa molar por cromatografia de permeação em gel - (GPC)**

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é um procedimento analítico no qual as moléculas são separadas por diferenças no tamanho, para obtenção das massas molares médias ( $M_n$ ,  $M_w$  e  $M_z$ ). De maneira geral, o resultado obtido por GPC é uma curva de distribuição de tamanho molecular, que, ao ser realizado em detector sensível à concentração, produz uma curva representativa e relativa à massa molar. Com a calibração universal ou detector de espalhamento de luz, por exemplo, esta curva é convertida em distribuição de massas molares e as médias podem ser calculadas [46].

A curva para determinação da massa molar por calibração universal foi construída com padrões de poliestireno de massas molares numéricas médias ( $M_n$ ) conhecidas e iguais a 3000, 2980, 2500, 2000, 1000, 500, 436 e 300  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  sendo muito útil, pois um conjunto de colunas de exclusão deve ser calibrado com padrões monodispersos.

Os resultados das massas molares do polímero PLA, assim como a polidispersão (PD) estão sumarizados na Tabela 2. É possível observar que existe uma diferença nos valores absolutos comparando-se os diferentes métodos de determinação da massa molecular. O maior valor encontrado de  $M_w$  foi de 2938 pela equação de Mark-Houwink  $[\eta] = K \cdot M^a$  [46]. O método de determinação absoluta (espalhamento de luz) indicou o  $M_w$  igual a 2469, enquanto que, por calibração universal, foi de 2186, gerando uma diferença de aproximadamente 13%. A maior diferença, que atinge o valor aproximado de 36%, está na determinação do  $M_n$  que, para o método absoluto é 2279 e, para calibração universal, 1680. A massa molar numérica média ( $M_n$ ) pode ser definida como a massa da amostra em gramas ( $W_i$  ou  $NiMi$ ) dividida pelo número total de cadeias ( $Ni$ ). As espécies de massa molar elevada influenciam o valor de  $M_w$  enquanto que o  $M_n$  é influenciado mais significativamente pelas cadeias menores. Portanto, era de se esperar que o valor de  $M_n$  obtido através da calibração universal fosse menor, visto que este está voltado para a separação de

polímeros de baixa massa proporcionando uma maior separação das frações da amostra de poli(ácido láctico) resultando em uma integral mais larga.

TABELA 2  
Massas molares determinados para o poli(ácido láctico).

	Espalhamento de Luz	Calibração Universal
Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	2469	2186
Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	2279	1680
Mz (g.mol <sup>-1</sup> )	2732	2534
PD	1,08	1,30

Wang et al [40] relataram que a polimerização por policondensação é uma rota menos dispendiosa para produzir poliésteres, porém difícil de se obter altas massas molares. Descreveram, ainda, que as massas molares obtidas para esse polímero giram na faixa de 10.000 g.mol<sup>-1</sup> e 20.000 g.mol<sup>-1</sup>, ainda assim bem acima dos valores obtidos neste trabalho. Esta variação pode ser atribuída aos métodos diferentes de separação e purificação do polímero.

Estes valores, apesar de serem baixos, ainda capacitam o polímero PLA a ser empregado como sistema de liberação controlada de fármacos. Usualmente, a aplicação de polímeros a partir do ácido láctico em sistemas biodegradáveis para a liberação de fármacos emprega polímeros de massa molar até 30.000 g.mol<sup>-1</sup>[44]. Assim, o polímero obtido pode ser encaixado como adequado a esta aplicação.

#### 5.4.1.2. Demais técnicas (TGA, DSC, GRANULOMETRIA)

As demais técnicas para avaliação do PLA estão discutidas mais adiante, juntamente com os demais materiais, para uma análise conjunta.

## 5.4.2. Caracterização dos materiais de partida, conjugado e nanopartículas

### 5.4.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 12 mostra os espectros da heparina e do ácido esteárico, puros, a formulação do conjugado entre heparina e o ácido esteárico, bem como a mistura física.

O ácido esteárico foi escolhido como reagente para a formação do conjugado com a heparina devido à sua cadeia carbônica suficientemente longa, para deixar o conjugado mais hidrofóbico além de apresentar apenas um ponto reativo, a carboxila, que pode se ligar ao fármaco.

A análise do espectro do ácido esteárico revelou uma banda vibracional afilada em  $2927\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $2852\text{ cm}^{-1}$  referente à  $\nu(\text{C-H})$ , assim como as bandas em  $1703\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C=O})$  e em  $1220\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C-O-H})$ . Além destas, uma banda com absorção em  $3350\text{ cm}^{-1}$  correspondente às hidroxilas sobreposta às bandas de absorções de  $(\text{C-H})$ .

O espectro de heparina apresenta bandas características bastante marcantes tais como a absorção em  $1730\text{ cm}^{-1}$  referente aos grupamentos carboxílicos e o estiramento  $(\text{S=O})$  assimétrico deslocado em  $1325\text{ cm}^{-1}$  e outro estiramento simétrico forte em  $1140\text{ cm}^{-1}$  referente à sulfonamida. Em  $3350\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada uma banda característica do estiramento  $(\text{N-H})$  e  $(\text{OH})$ .

Ao realizar a mistura física entre ácido esteárico e a heparina, o espectro apresentado mostra mais uma vez uma sobreposição de bandas, com uma sensível diminuição da banda com absorção em  $3500\text{ cm}^{-1}$ , uma banda em  $1703\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C=O})$  característica do ácido esteárico e outra em  $1340\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $(\text{S=O})$  de sulfonamida da heparina.

Similarmente ao que ocorre com a heparina, a observação do espectro do conjugado entre ácido esteárico e heparina apresentou características singulares tanto do ácido quanto da heparina. A diminuição da banda em  $3500\text{ cm}^{-1}$  característico de hidroxila, a manutenção das bandas com absorções em  $1340\text{ cm}^{-1}$  e em  $1550\text{ cm}^{-1}$  características do grupamento sulfonamida, além da banda em  $3350\text{ cm}^{-1}$ , relativa às hidroxilas remanescentes.

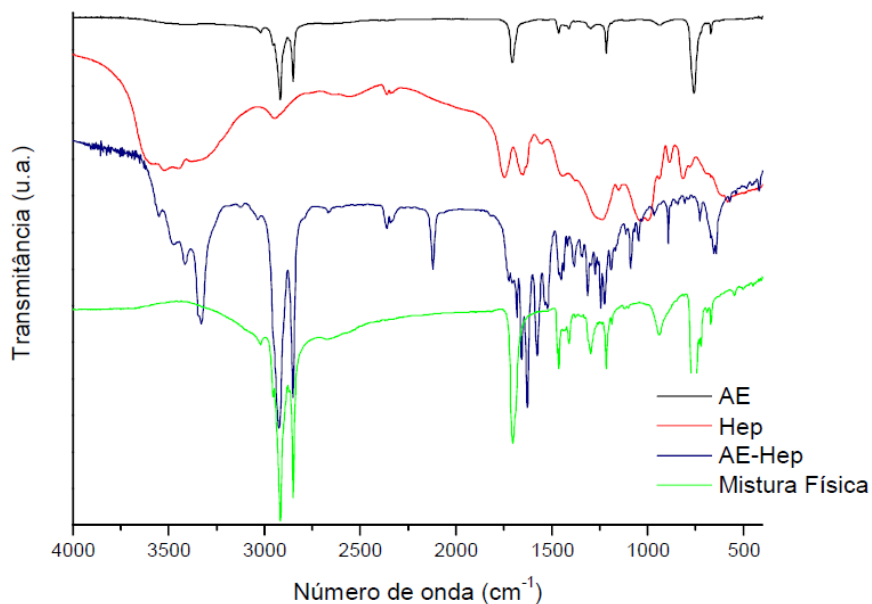


Figura 12 - Espectro de infravermelho comparativo: conjugado, mistura física, heparina e AE.

Estes dados sugerem que a reação para a formação do conjugado tenha realmente ocorrido.

#### 5.4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear - (RMN)

São apresentados os espectros da análise de  $^1\text{H}$  RMN da heparina bem como do conjugado entre heparina e ácido esteárico.

A heparina é um polímero natural complexo, apresenta uma grande quantidade de hidrogênios diferentes em sua estrutura. Desta forma, ao ser obtido seu espectro por  $^1\text{H}$  RMN, a quantidade de sinais que se sobrepõem é grande.

A própria literatura não difunde uma análise mais profunda de espectros de  $^1\text{H}$  RMN para a heparina. No entanto é citado de que a região de 3 a 4 ppm corresponde à “impressão digital” deste fármaco (Figura 13).

Dentre os sinais observados, uma especial atenção foi dada para a região espectral em que o grupo N-acetil aparece em 2,05 ppm.

Além disso, deve ser ressaltado um sinal característico da heparina 1,92 ppm (multiplete) atribuído ao deslocamento químico do grupamento sulfonamida.

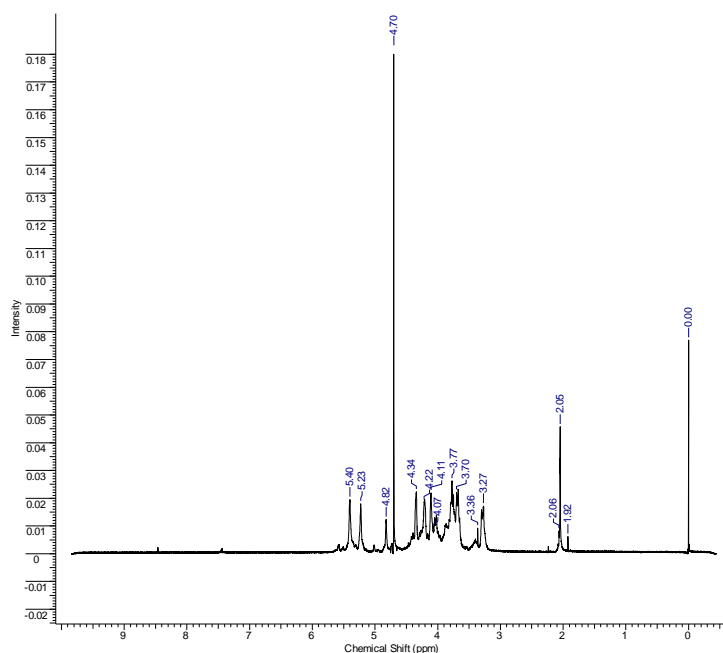


Figura 13 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da heparina utilizando solvente DMSO- $\text{d}_6$

Na Figura 14 está apresentado o espectro do material conjugado derivado da heparina e do ácido esteárico.

O ácido esteárico puro apresenta deslocamentos em 0,88 ppm (triplete) correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono da metila e o deslocamento em torno de 1,63 ppm referente aos hidrogênios adjacentes ao grupo carbonila por serem levemente desblindados.

Alguns deslocamentos presentes no ácido esteárico bem como a região correspondente à “impressão digital” da heparina, porém com sinais menos intensos, também são visualizados no espectro do conjugado.

Apesar de um espectro com sinais sobrepostos, verifica-se que há sinais característicos dos materiais de partida e que é possível sugerir a formação do conjugado, uma vez que seu espectro difere dos sinais presentes na heparina.

Observou-se novamente o deslocamento em 1,3 ppm (Figura 14) muito similar àquele da Figura 13, característico de grupamento sulfonamida da heparina.

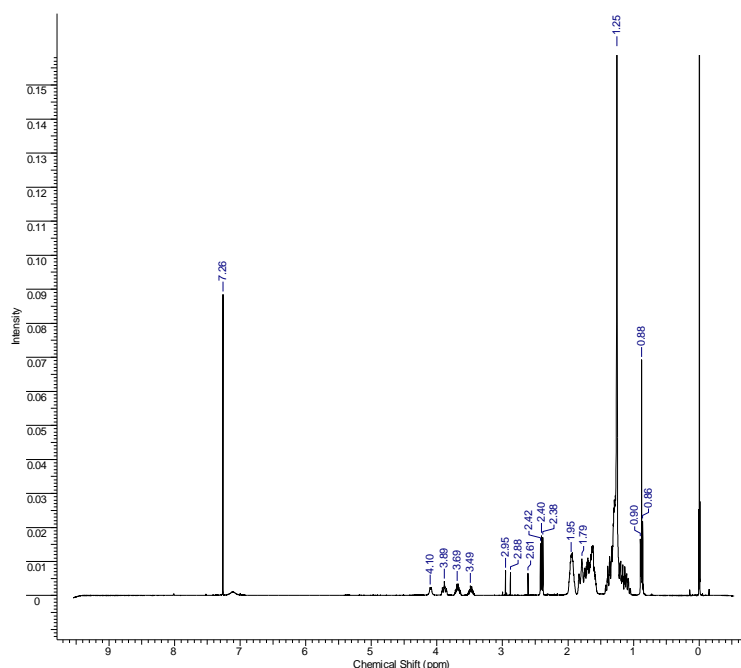


Figura 14 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do conjugado HEP/AE utilizando solvente DMSO- $d_6$

A efetiva elucidação estrutural de compostos é possível por RMN e esta constitui a técnica mais adequada para este fim. Neste caso, porém, esta avaliação é bastante complexa, considerando que a heparina é constituída por inúmeros grupamentos que resulta num espectro de difícil interpretação, além da difícil solubilização de heparina e de seu derivado, em solvente adequado, para a utilização desta técnica de caracterização. Esta mesma consideração deve ser levada para o conjugado heparina/ácido esteárico, objeto do presente trabalho.

#### 5.4.2.3. Difratometria de raios-X - (DRX)

A análise por DRX (Figura 15) revelou picos estreitos de cristalinidade do ácido esteárico puro, bem como para a mistura física e para o conjugado entre heparina e ácido esteárico, indicando a presença de regiões cristalinas nos materiais estudados. O difratograma da heparina mostrou um pico de cristalinidade em  $2\theta = 44^\circ$ , bem como um halo amplo centrado em  $2\theta = 25^\circ$ , referente à região amorfa do material. O perfil do difratograma do ácido esteárico revelou picos de cristalinidade em  $2\theta = 6^\circ$ ,  $2\theta = 11^\circ$ ,  $2\theta = 21^\circ$  e  $2\theta = 21^\circ$ , mostrando-se semelhante ao da mistura física.

O difratograma do conjugado entre heparina e ácido esteárico mostrou alterações nas intensidades dos picos de cristalinidade e novos picos apareceram após a reação de conjugação. Três picos de difração próximos de  $2\theta = 20^\circ$ ,  $2\theta = 21^\circ$

e  $2\theta = 24^\circ$  foram observados no conjugado e são referentes ao ácido esteárico. Ainda pode ser observado, no difratograma do conjugado dois pequenos picos de cristalinidade indicativos da heparina,  $2\theta = 32^\circ$  e  $2\theta = 37^\circ$ , sendo que o pico de maior intensidade  $2\theta = 44^\circ$  diminuiu de intensidade, sugerindo um perfil semelhante o da heparina.

Ainda em relação ao conjugado, observa-se que no difratograma há um pequeno pico em  $32,6^\circ$  referente à heparina. O aparecimento de novos picos de cristalinidade no conjugado entre heparina e ácido esteárico pode ser atribuído a uma interação química entre estes componentes, produzindo novas regiões cristalinas. Portanto, estes resultados sugerem a confirmação da reação.

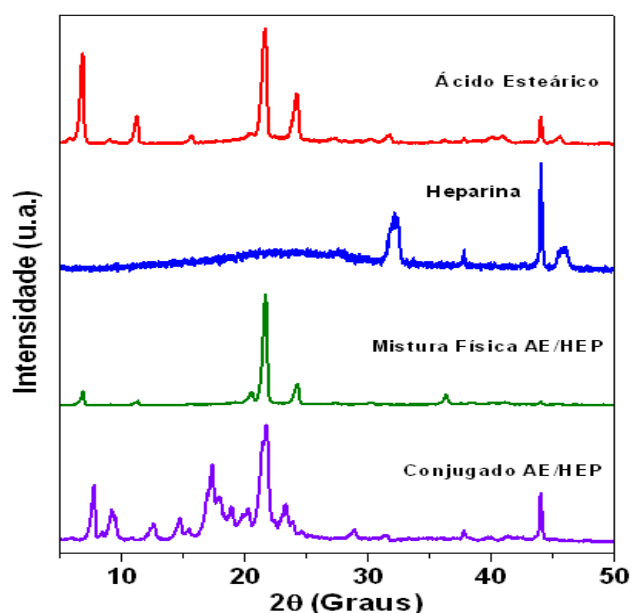


Figura 15 – Difratogramas do AE, heparina e mistura física AE/HEP comparativamente ao difratograma do conjugado AE/HEP.

Na mistura física, entre ácido esteárico (70%) e heparina (30%), são observados alguns picos que representam regiões cristalinas referentes ao ácido esteárico conforme relatado anteriormente, embora também tenham sido observadas as alterações nas intensidades dos picos, correspondentes às regiões cristalinas.

Considerando que a mistura física foi preparada nas porcentagens acima citadas e que houve uma solubilização dos materiais puros em solvente adequado para que a mistura ficasse o mais homogênea possível, conclui-se que a diferença nas intensidades dos picos de cristalinidade da mistura física é diminuída devido ao processo de solubilização.

O difratograma da mistura física apresentou um perfil bastante diferenciado quando comparado ao conjugado.

#### 5.4.2.4. Análise termogravimétrica (TGA)

As amostras dos materiais de partida e aquelas obtidas após a reação de conjugação, bem como o material encapsulado, estão sumarizadas na Figura 16.

Também são apresentadas as derivadas das curvas obtidas por termogravimetria (Figura 17) para um comparativo complementar em termos de número de etapas de perdas de massa.

O ácido esteárico (Figura 17-a) apresenta uma elevada resistência térmica, já que mantém sua massa constante em torno de 250°C, quando inicia o processo de degradação contínua até atingir 100% de perda de massa em 310°C, ocorrendo em uma única etapa.

O PLA (Figura 17-b) revela dois eventos pronunciados de perda mássica. O primeiro evento ocorre na faixa de 150°C, quando 10% de sua massa é degradada e aproximadamente em 350°C ocorre sua completa degradação.

De forma surpreendente, a heparina (Figura 17-e) apresenta três etapas de perda mássica, mostrando-se resistente à degradação térmica. Em torno de 100°C ocorre uma perda de massa associada à eliminação de moléculas de água, visto que a heparina, quando na forma sólida, apresenta-se como um sólido higroscópico. Ao ser submetida a aquecimento, a 250°C ocorre 40% de perda mássica, apresentando grande resistência até aproximadamente 700°C quando há degradação, mas não total (sobra cerca de 30% como resíduo).

Quando ocorre uma associação entre a heparina e o ácido esteárico, formando o conjugado, é possível afirmar que ocorrem mudanças significativas quando comparado aos materiais de partida. Ao analisar a derivada primeira (Figura 17-c) é possível verificar três eventos térmicos distintos. Ao ser submetido a aquecimento até 110°C não ocorrem perdas mássicas, no entanto a 150°C, 15% de sua massa inicial é degradada, a 250°C e a 320°C ocorre degradação total.

Portanto, o conjugado não apresenta uma degradação linear como o ácido esteárico, tampouco resistência térmica estendida como a heparina.

Ao serem analisadas as nanopartículas, por termogravimetria, verifica-se um comportamento térmico intermediário ao polímero e ao conjugado. Sua primeira perda de massa ocorre em aproximadamente 200°C, enquanto que, a 340°C ocorre uma perda de 70% de sua massa (Figura 17-d), algo similar ao que ocorre com o



conjugado; e, em 450°C ocorre degradação total, sendo reforçada a ideia de que a heparina está ligada ao ácido esteárico, o que confere ao conjugado maior resistência térmica.

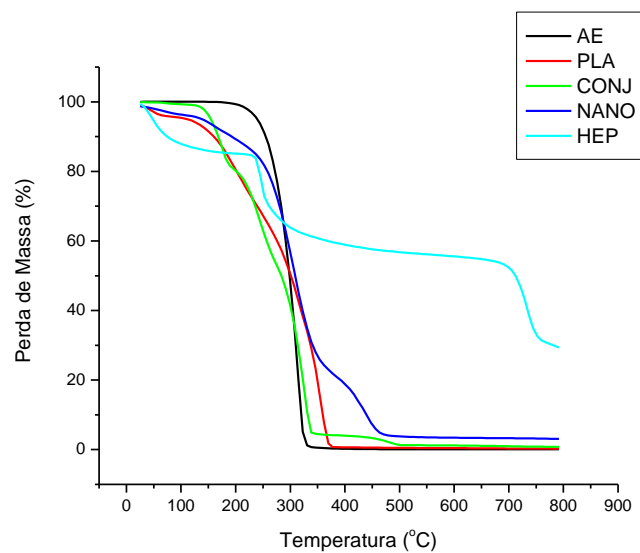


Figura 16 – Termogramas obtidos por análise termogravimétrica em atmosfera inerte de N<sub>2</sub>.

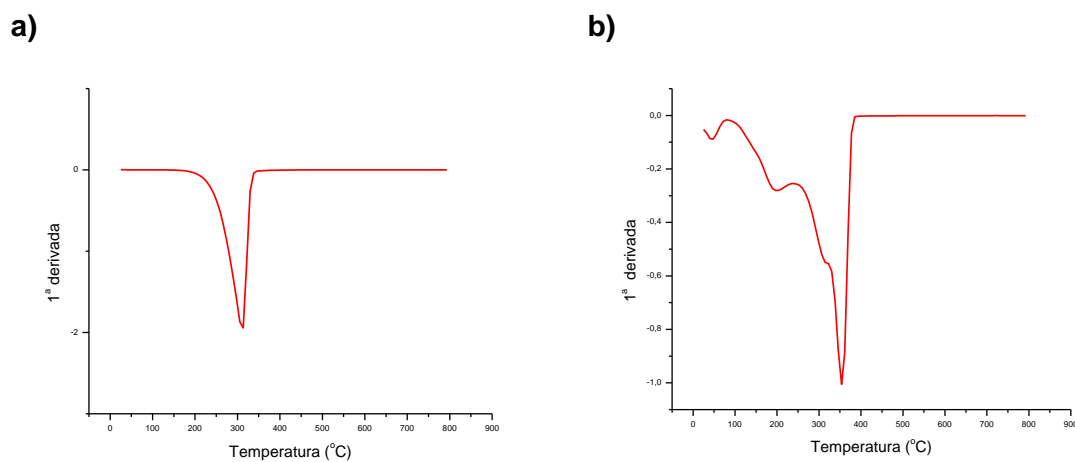
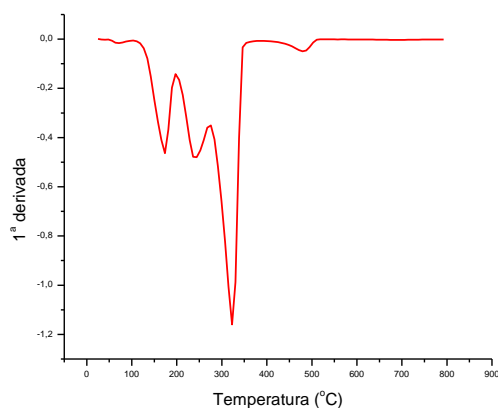


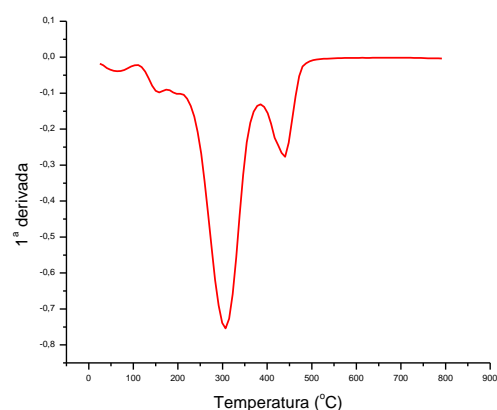
Figura 17 – Derivada primeira dos termogramas obtidos por análise termogravimétrica:

a) AE; b) PLA

c)



d)



e)

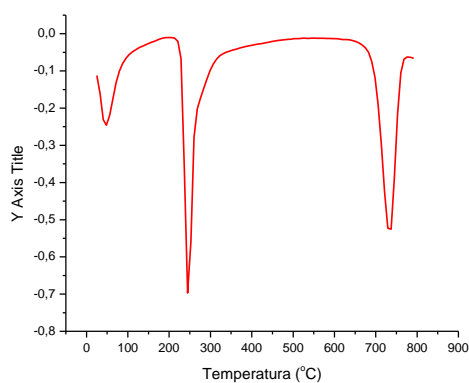


Figura 17 (continuação) – Derivada primeira dos termogramas obtidos por análise termogravimétrica: c) CONJUGADO; d) NANOPARTÍCULA; e) HEPARINA.

#### 5.4.2.5. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial - (DSC)

As curvas do comportamento térmico obtidas por DSC dos materiais AE, heparina, PLA, mistura física entre heparina e AE, conjugado, nanopartículas e mistura física conjugado/PLA são apresentados na Figura 18.

O termograma AE puro (Figura 18-a) revela em seu aquecimento, fusão a 72°C e, no resfriamento, uma temperatura de cristalização em torno de 60°C. Este fato se deve a uma reorganização das cadeias.

A heparina (Figura 18-b), quando submetida à análise por DSC, apresentou, em 250°C um pico exotérmico característico, referente à fusão, conforme difundido na literatura. O referido pico não aparece após o tratamento térmico da heparina.

A curva do PLA (Figura 18-c) apresentou dois eventos térmicos notáveis: um em 32°C, referente à temperatura de transição vítrea e outra em 340°C correspondente ao ponto de fusão do polímero.

Na curva da mistura física (Figura 18-d), foi possível observar dois eventos distintos: um pico endotérmico em torno de 70°C, característico da fusão do ácido esteárico e um evento exotérmico, porém não tão pronunciado, em 250°C referente à heparina. Observou-se que o evento térmico de fusão do AE apresentou uma pequena diminuição quando comparado com a espécie pura e para a heparina seu perfil foi bastante semelhante.

Para o conjugado (Figura 18-e) são apresentadas três rampas de aquecimento, para que seja verificado o seu comportamento. O primeiro aquecimento ocorreu até 130°C e o seu resfriamento correspondente (linha preta) até -20°C. O segundo aquecimento (linha vermelha) apresenta eventos endotérmicos de fusão (em 72°C, 170°C e em 275°C correspondente a uma possível degradação do material). O segundo resfriamento (linha verde), realizado até -20°C apresenta um pico exotérmico correspondente à cristalização do ácido esteárico. No terceiro aquecimento (linha azul) foi possível observar apenas a fusão do ácido esteárico em torno de 80°C. Nota-se uma diminuição nas temperaturas de fusão do AE e da heparina, para 50°C e 160°C respectivamente, indicando a associação entre os dois componentes.

Também foram avaliados por DSC os comportamentos das nanopartículas e da mistura física entre o conjugado e o PLA (Figuras 18-f e 18-g). Através do termograma das nanopartículas é possível concluir que as temperaturas observadas correspondem às fusões do AE (75°C) e do polímero (310°C), enquanto que, na mistura física, foram verificadas uma transição vítrea em 50°C e uma fusão em 310°C.

Os eventos notados nos termogramas podem sugerir que houve a formação de uma ligação entre o AE com a heparina, uma vez que, em todas as curvas, foi observado um deslocamento nos valores das temperaturas de fusão quando comparada à dos materiais puros, o que não ocorreu com as misturas físicas. Este fato é um indicativo de que, para os produtos de reação, houve um aumento do tamanho da molécula e/ou sua estrutura foi modificada e, nas misturas físicas, apenas houve uma interação física entre os materiais, mas os componentes respondem independentemente.

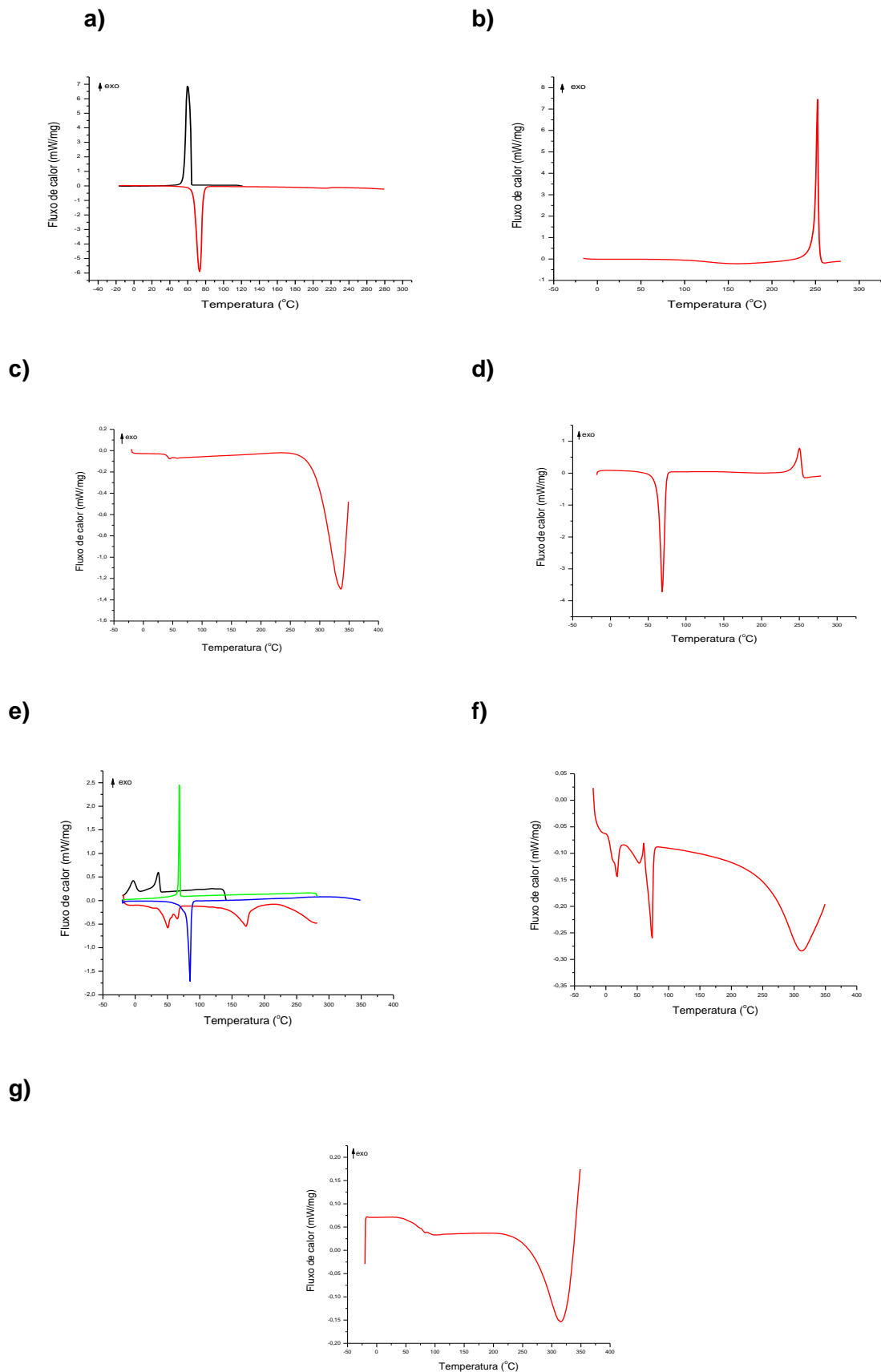


Figura 18 - Termogramas resultantes da análise calorimétrica: a) AE; b) HEPARINA; c) PLA; d) M.F AE/HEP; e) CONJUGADO; f) NANOPARTÍCULA; g) Mistura física CONJ./PLA

#### 5.4.2.6. Análise granulométrica

A Figura 19 apresenta as curvas referentes às distribuições granulométricas para os materiais mais relevantes obtidos neste trabalho: PLA, CONJUGADO AE/HEPARINA e NANOPARTÍCULAS.

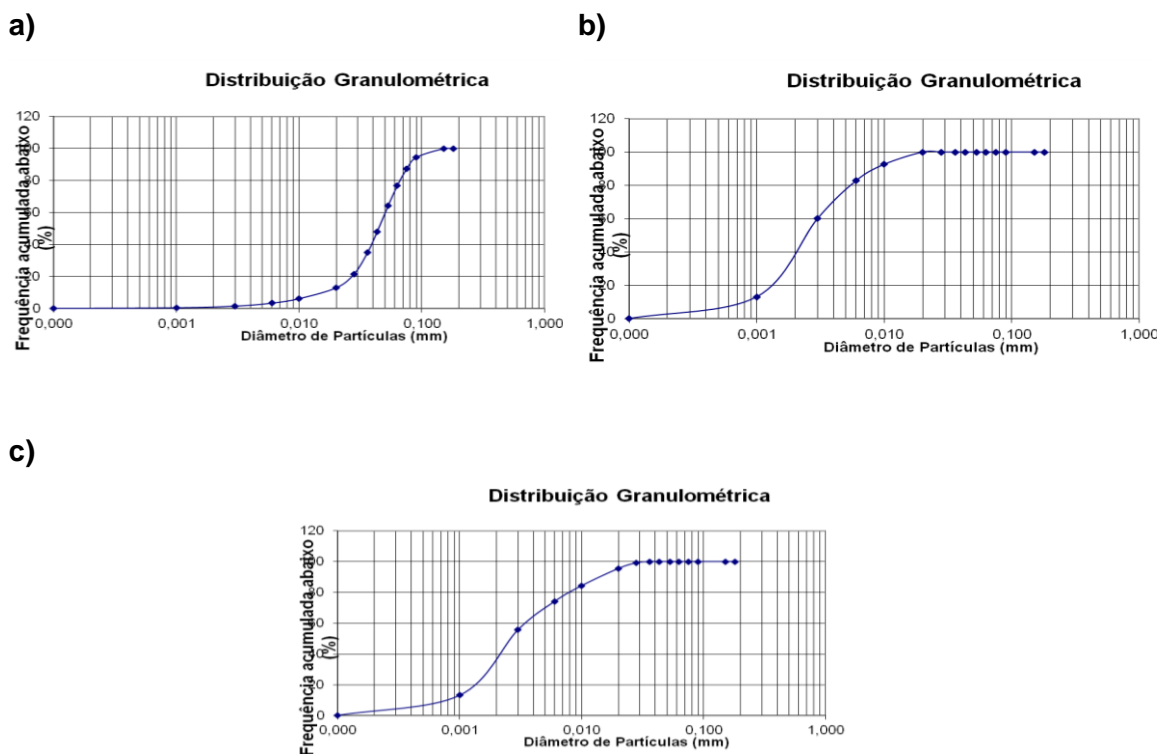


Figura 19 – Curvas analíticas para os perfis granulométricos: a) PLA; b) CONJUGADO; c) NANOPARTÍCULAS.

A avaliação dos perfis granulométricos de distribuição do polímero de partida, bem como os do conjugado e das nanopartículas, apesar de apresentar diâmetros diferenciados, revelou um aumento no diâmetro médio, em micrometro, quando comparados conjugado e nanopartículas.

Esta mesma observação foi constatada por meio dos valores de diâmetros de partículas encontrados, correspondentes a 10, 50 e 90% da distribuição de tamanhos acumulada para cada amostra analisada (Tabela 3). Além disso, comparando o diâmetro médio das nanopartículas com o do conjugado, é possível sugerir que este tenha sido encapsulado e que o processo de nanoprecipitação tenha sido eficiente, já que houve um aumento no valor do diâmetro.

Os valores de Span (Tabela 3), relacionados com a uniformidade de tamanho das partículas, encontraram-se acima de 2 tanto para conjugado quanto para as nanopartículas, sendo portanto, considerados como polidispersos segundo a literatura.

TABELA 3  
Dados sobre a dispersão granulométrica das partículas

Amostras	d (v, 10%) ( $\mu\text{m}$ )	d (v, 50%) ( $\mu\text{m}$ )	d (v, 90%) ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Span
PLA	16,00	44,20	79,54	46,74	1,43
CONJUGADO	0,88	2,42	8,81	3,61	3,27
NANOPARTÍCULAS	0,92	2,58	14,03	5,15	5,09

#### 5.4.3. Caracterização das nanopartículas

Além das caracterizações das nanopartículas, discutidas em conjunto com o conjugado e os materiais de partida, também foram avaliadas separadamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e citotoxicidade em hemácias.

##### 5.4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas elaboradas a partir do conjugado de heparina com ácido esteárico encapsuladas em poli(ácido lático) indicou um formato relativamente homogêneo com partículas esféricas e em escala nanométrica, com tamanho médio de 900 nm.

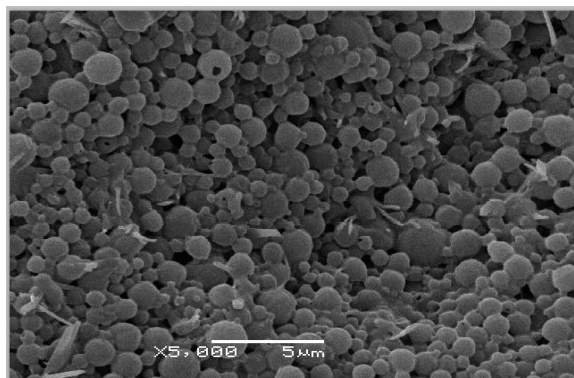


Figura 20 – Aspecto morfológico das partículas produzidas por emulsão simples (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento 5000 X)

Ao analisar a fotomicrografia com maior ampliação (10000 vezes) é notável que algumas partículas não foram completamente formadas, sendo que suas superfícies apresentaram regularidade e não foram observados poros.

Existem, ainda, fragmentos, cujos formatos não apresentam geometria determinada. Pode-se atribuir este fato à presença de PVAI utilizado como tensoativo no processo de encapsulação.

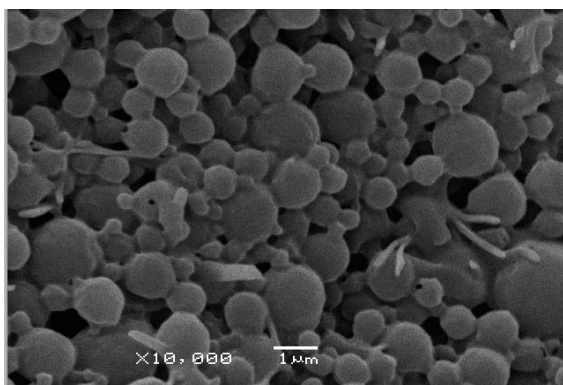


Figura 21 – Aspecto morfológico das partículas produzidas por emulsão simples (fotomicrografia visualizada por MEV, aumento 10000 X)

#### 5.4.3.2. Avaliação da citotoxicidade do conjugado em hemácias

A análise dos dados obtidos no ensaio de citotoxicidade sobre os eritrócitos não mostrou diferença significativa entre o branco e o conjugado, nas concentrações de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  ou de  $10\text{mg.mL}^{-1}$  indicando que o conjugado formado entre o PLA e o AE não causa lesão na membrana eritrocitária.

O conjugado não apresentou ação hemolítica visto que não foi observada formação de hemólise em nenhuma das concentrações testadas, permanecendo límpida a solução de soro fisiológico após a centrifugação. Ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha ocorrido a lise das células.

Também foi realizada uma análise qualitativa utilizando-se azul de toluidina para verificar se havia presença de heparina, no caso, conjugado de heparina com ácido esteárico, no interior da célula, tendo como resposta negativa a presença deste composto.

## 6. CONCLUSÕES

A proposta de síntese do poliéster a partir do ácido láctico foi concretizada.

As análises por FTIR apresentaram diminuição das bandas de hidroxila em  $3400\text{ cm}^{-1}$  presente na heparina, sugerindo a formação de conjugados, bem como manutenção das bandas com absorções em  $1340\text{ cm}^{-1}$  e em  $1550\text{ cm}^{-1}$  características do grupamento sulfonamida da heparina também presente no material conjugado.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN, embora de difícil interpretação, contribuem no sentido de comparar sinais característicos da heparina presentes no material conjugado.

As análises por DRX demonstram diferenças nos perfis de cristalinidade entre os materiais de partida e os conjugados formados sugerindo a formação de um novo material.

Os dados obtidos através da análise térmica por TGA comparativo aos materiais de partida, conjugado e nanopartículas, demonstra um comportamento térmico diferenciado, sugerindo que novas estruturas foram obtidas.

As análises térmicas por DSC corroboram com as demais análises, pois os eventos térmicos para o conjugado da heparina com o ácido esteárico apresentaram um comportamento diferenciado quando comparados aos materiais de partida.

Os dados de granulometria a laser indicaram valores diferenciados nos diâmetros médios das partículas, sugerindo que ocorreu o processo da encapsulação.

A microscopia eletrônica de varredura revelou uma morfologia relativamente homogênea das partículas, sugerindo que a escala nanométrica foi atingida, conforme os objetivos do trabalho.

A análise citotóxica em hemácias comprovou que o material conjugado não apresenta atividade tóxica a estas células, indicando que os possíveis resíduos de reagentes considerados ofensivos às células foram totalmente removidos ou estão em concentrações ínfimas consideradas inofensivas à atividade celular.

De forma geral, ao analisar o conjunto das técnicas de caracterização empregadas para analisar conjugado e nanopartículas, é sugerido que a reação de conjugação e o processo de nanoencapsulação realmente ocorreram.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] LEE, S.H., ZHANG, Z. & FENG, S-S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polythylene (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. *Biomaterials* v.28, p.2041-2050 (2007).
- [2] JIAO, Y.; UBRICH, N.; MARCHAND-AVIER, M.; VIGNERON, C.; HOFFMAN, M.; LECOMPTE, T. & MAINCENT, P. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation* v.105, p.230-235 (2002).
- [3] NORI, A. & KOPECEK, J. Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* v.57, p.609-636 (2005).
- [4] LOTSPEICH-STEININGER, C. A. Introduction to homeostasis. *Clinical Hematology: principles, procedures, correlations*. Philadelphia: Lippincot, p.599-611 (1998).
- [5] MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. V. 222, P 498-499 (1964)
- [6] FRANCO RF; DE JONGE E; DEKKERS PEP; TIMMERMAN JJ; SPEK CA; VAN DEVENTER SJH; VAN DEURSEN; VAN KERKHOFF L; VAN GEMEN B; TEM CATE H; VAN DER POLL & REITSMA PH. The in vivo kinetics of tissue factor mRNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood* 96: 554-559 (2000).
- [7] BOUÇAS, R.I; SAMPAIO, L.O; et al. Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis. *Insights into Carbohydrate structure and Biological function*. V.2, p 25-50 (2006).
- [8] COLMAN, R.W et al. Hemostasis and thrombosis. Basics principles and clinical practice 5ed. Philadelphia : Lippincot Williams & Wilkins. P. 1279-97 (2006)
- [9] – TRINDADE, E.S. Caracterização do mecanismo de estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato em células endoteliais, pela heparina. Tese de Doutorado, UNIFESP (2004).

- [10] MULLOY, B.; HOGWOOD, J.; GRAY, E. Assays and reference materials for current and future applications of heparins. *Biologicals* v.38, p.459-466 (2010).
- [11] PENDLETON, R. C.; RODGERS, G. M.; HULL, R.D. Established Venous thromboembolism Therapies: Heparin, Low Molecular Weight Heparins, and Vitamin K Antagonists, with a Discussion of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Clin Chest Med* v.31, p. 691-706 (2010)
- [12] SAKR, Y.; HAETSCHER, F.; Heparin-induced thrombocytopenia type II in a surgical intensive care unit. *Journal of Critical Care* v.27, p.232-241 (2012).
- [13] PINEO, G.; HULL, R. & MARDER, V. oral delivery of heparin: SNAC and related formulation. *Best practice & Research Clinical Haematology* v.17, p.153-160 (2004).
- [14] MARSHAL, P.S.; CAIN, H. Upper Extremity Deep Vein Thrombosis. *Clin Chest Med*. v.31, p. 783-797 (2010)
- [15] ADEGHI, G. M. M. & BARIKANI, J.M. Determination of OH-number and functionality of polybutadiene-ol by TIR and NMR spectroscopy. *J. Allergy Clin Immunol* v. 128, p. 1310-1325 (2011).
- [16] D'ILARIO, I.; FRANCOLINI, I.; MARTINELLI, A.; PIOZZI, A.; Insight into the Heparin–Toluidine Blue (C.I. Basic Blue 17) interaction. *Dyes and Pigments*. v.80, p.343-348 (2009).
- [17] KUMARI, A. et al. Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.82, p.224–232 (2011).
- [18] BRIGER, I., DUBERNET, C. & COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews* v.54, p.631-651 (2002).
- [19] OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. *Revista eletrônica de farmácia*. v.3, p.29-35 (2006).
- [20] PAULA, J. P. Síntese, caracterização e avaliação biológica de poliésteres biodegradáveis e sua utilização na preparação de nanopartículas. Tese de Doutorado, UFPR (2009).

- [21] HUGHES, J.; THOMAS, R.; BYUN, Y.; WHITESIDE, S. Improved flexibility of thermally stable poly-lactic acid (PLA). *Carbohydrate Polymers* v.88, p.165-172 (2012).
- [22] JAHNO, V. D.; LIGABUE, R.; EINLOFT, S.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, M. R. W. F.; BOMBONATO-PRADO, K. F.; Síntese e caracterização do poli(ácido L-lático) e sua avaliação em culturas de osteoblastos humanos. *Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
- [23] CHEN, G.; KIM, H.; KIM, E. & YOON, J. Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid through the direct condensation polymerization of lactic acid in bulk state. *European polymer journal* v.42, p.468-472 (2006).
- [24] KUMARI, A.; YADAV, S. K.; PAKADE, Y. D.; KUMAR, V.; SINGH, B.; CHAUDHARY, A.; YADAV, S.C. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.82, p.224-232 (2011).
- [25] PENG, Y. L.; HUANG, Y.; CHANG, H. J.; KUO, C. Y.; LIN, C. C. Synthesis and characterization of biodegradable polylactides and polylactide-block-poly(Z-lysine) copolymers. *Polymer* v.51, p.4329-4335 (2010).
- [26] INKINEN, S.; HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A. C.; SODERGARD, A. Macromolecular Design of Aliphatic Polyesters with Maintained Mechanical Properties and a Rapid, Customized Degradation Profile. *Biomacromolecules* v.12, p.523–532 (2011).
- [27] LIM, L.T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid) *Progress in Polymer Science* 2008; v.33, p.820–852 (2008).
- [28] YE, R. R.; WANG, Z. Y.; WANG, Q. F.; YANG, K.; LUO, S. H. Synthesis of biodegradable material poly(lactic acid-co-aspartic acid) via direct melt polycondensation and its characterization. *Journal of Applied Polymer Science* v.121, p.3662–3668 (2011).
- [29] BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability* v.59, p.129-135 (1998).

- [30] RANCAN, F.; PAPAKOSTAS, D.; HADAM, S.; HACKBARTH, S.; DELAIR, T.; PRIMARD, C.; STERRY, B. W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharmaceutical Research* v.26, p.2027-2036 (2009).
- [31] CHHABRA, S., SACHDEVA, V. & SINGH, S. Influence of end groups on in vivo release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. *International journal of pharmaceuticals* v.342, p.72-77 (2007).
- [32] VIEIRA, A.C. et al. Mechanical study of PLA–PCL fibers during in vitro degradation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* v., p.451 – 460 (2011).
- [33] CHESHMEDZHIEVA, D.; ANGELOVA, I.; ILIEVA, S.; GEORGIEV, G. S.; GALABOV, B. Initiation of ring-opening polymerization of lactide: The effect of metal alkoxide catalyst. *Computational and Theoretical Chemistry* v.995, p.8-16 (2012).
- [34] MIAO, Q.; XU, D.; WANG, Z.; XU, L.; WANG, T.; WU, Y.; LOVEJOY, D. B.; KALINOVSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R.; NIE, G.; ZHAO, Y. Amphiphilic hyper-branched co-polymer nanoparticles for the controlled delivery of anti-tumor agents. *Biomaterials* v.31, p.7364-7365 (2010).
- [35] AHMED, J.; VARSHNEY, S. K. Polylactides—Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review. *International Journal of Food Properties*, v.14, p.37–58 (2011).
- [36] KOWALCZYK, M.; PIORKOWSKA, E.; KILPINSKI, P.; PRACELLA, M. Mechanical and thermal properties of PLA composites with cellulose nanofibers and standard size fibers. *Composites* v.42, p.1509–1514 (2011).
- [37] KIM, S. K.; VAISHALI, B.; LEE, E.; LEE, S.; LEE, Y.; KUMAR, T.S.; MOON, H.T. & BYUN, Y. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. *Thrombosis Research*, 117(4), 419-427, 2005.

- [38] MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J.M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*. v.154, p.2-19 (2011).
- [39] FIGUEIREDO, E. C.; BASILE, A.C.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas* v.44, p.361-375 (2009).
- [40] THOLSTRU, T.; MARCKMANN, P.; JERSPERSEN, J.; SANDSTORM, B. Fat high in stearic acid favorably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauritic acids. *Am. J.Clin. Nutr.* 59: 371- 377 (1994)
- [41] CZELUSNIAK, I.; SZYMANSKA-BUZAR, T. Synthesis and characterization of polylactide functionalized polyacetylenes. *European Polymer Journal* v.47, p.2111-2119 (2011).
- [42] YILDIZ, A.; OKYAR, A.; BAKTIR, G.; ARAMAN, A.; OZSOY, Y.; Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid). *Il Farmaco*. v.60, p.919-924 (2005).
- [43] JEE, K.S.; PARK, H.D.; PARK, K.D.; KIM, Y.H.; SHIN, J.W.. Heparin conjugated polylactide as a blood compatible material. *Biomacromolecules*. v.5, p.1877-1881 (2004).
- [44] WANG, Z.; XIAONA, H.; MAO, Z.; YE, R.; MO, Y.; FINLOW, D. E. Synthesis and Characterization of Biodegradable Poly(lactic acid-co-glycine) via Direct Melt Copolymerization. *Iranian Polymer Journal* v.17, p.791–798 (2008).
- [45] FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; GYENIS, J. Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007
- [46] STRIEGEL, A. M.; YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*. New Jersey: Second edition, John Wiley Sons, Hoboken (2009).

[47] LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. Caracterização de polímeros: Determinação de Massa molecular e Análise Térmica. Rio de Janeiro: e-papers (2001) (capítulo 7).